

1

**VACCIN THERAPEUTIQUE CIBLE CONTRE LA P-GLYCOPROTEINE
170 POUR INHIBER LA RESISTANCE MULTIDROGUES DANS LE
TRAITEMENT DES CANCERS**

5

Domaine technique

La présente invention s'inscrit dans le cadre de la recherche et de la mise au point de nouveaux agents utiles pour traiter la résistance multidrogues (résistance pléiotropique ou résistance multidrogues) apparaissant chez certains patients lors du traitement de cancers.

L'invention relate en particulier des agents utilisables pour induire une réponse immunitaire chez des patients souffrant de résistance multidrogues en cours de traitement d'un cancer, dans le but d'atténuer, voire de réverser cette résistance. L'invention concerne aussi de tels agents pour prévenir l'apparition de résistance multidrogues.

L'invention concerne à cet égard une composition comprenant d'une part un véhicule et d'autre part des conjugués formés par liaison covalente entre une région peptidique et des molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24, ladite partie peptidique étant dérivée d'au moins l'une des boucles extracellulaires de la protéine P-170. Cette composition immunogène, administrée dans des conditions appropriées permet l'induction d'anticorps anti-P-170.

L'invention concerne également des procédés d'immunisation utilisant les compositions précédentes à base de conjugués associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable, par exemple des liposomes. L'invention concerne en particulier des procédés d'immunisation dont la mise en œuvre précède, est concomitante ou suit une étape de traitement chimiothérapeutique administré à un patient.

L'invention concerne enfin l'utilisation de la composition selon l'invention pour le traitement *in vivo* de la résistance multidrogues, apparaissant chez un patient souffrant d'un cancer traité au moyen de médicaments anticancéreux, ou le cas échéant pour la prévention d'une telle résistance multidrogues.

35

Etat de la technique

Le phénomène de résistance multidrogues (MDR) a été mis en évidence à la fin des années 70 sur des lignées de cellules cancéreuses rendues résistantes à des drogues chimiothérapeutiques notamment des drogues utilisées pour le traitement de cancers. La résistance multidrogues se caractérise par une résistance pléiotropique, vis à vis de drogues chimiothérapeutiques utilisées pour le traitement d'un patient, lorsque ces drogues ont des structures et des spécificités différentes. Parmi les drogues capables de sélectionner ou d'induire la résistance pléiotropique de la cellule cancéreuse, on citera la colchicine, l'adriamycine, l'actinomycine, la vincristine, la vinblastine et la mitoxantrone. D'un point de

vue phénotypique la résistance multidrogues se caractérise par une diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues cytotoxiques, des modifications physiologiques de la cellule et une surexpression dans la membrane cellulaire de la protéine P-glycoprotéine encore appelée protéine P-gp ou encore protéine P-170 (Van der Bliek et al. 1988. Gene 71(2) : 401-411, Thiebaut et al. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. 84(21) : 7735-7738, Endicott et al. 1989 Annu. Rev. Biochem. 58 : 137-171). La protéine P-170 est responsable d'un flux actif des médicaments hors de la cellule (encore appelé l'efflux actif), ce phénomène étant dépendant de la consommation d'ATP. La reconnaissance par la protéine P-170 et l'excration hors de la cellule traitée, médiée par la protéine P-170 d'une grande variété de composés chimiques, de structures et de fonctions diverses, demeurent l'un des aspects les plus énigmatiques de la fonction de cette protéine. L'absence de la mise en évidence d'une caractéristique structurale commune entre les drogues faisant l'objet d'une résistance croisée ne permet pas d'envisager l'élaboration de drogues qui ne seraient pas expulsées, sous l'influence de la protéine P-170.

La résistance multidrogues des tumeurs aux agents de chimiothérapie constitue un problème central en cancérologie médicale. Tandis que des progrès dans les traitements de soutien sont observés, le problème de la résistance aux drogues demeure un obstacle à l'obtention de meilleurs taux de guérison. On constate que les cellules tumorales peuvent ne pas répondre à la chimiothérapie dès le début du traitement. Cette résistance multidrogues *de novo* est malheureusement fréquente dans plusieurs types de tumeurs solides. On a par ailleurs pu observer un phénomène de résistance acquise, se manifestant au niveau de tumeurs qui, au départ, ont répondu à la chimiothérapie et qui développent ensuite, à plus ou moins court terme, une résistance aux traitements.

Pour être plus efficaces, les traitements anticancéreux ont été associés à des agents modulateurs de la résistance multidrogues également nommés agents révertants pouvant bloquer le flux sortant de drogues médié par la protéine P-170, hors de la cellule et ainsi circonvenir la résistance multidrogues. Les agents révertants existants, tels que le vérapamil, la quinine et la ciclosporine, entraînent une toxicité inacceptable pour le patient lorsqu'ils sont utilisés aux doses nécessaires pour inhiber l'activité d'efflux de la protéine P-170. Par exemple, le vérapamil a rapidement montré ses limites dans le traitement de réversion de cancers du fait de l'apparition chez le patient de dysfonctionnements tels que l'hypotension, l'arythmie cardiaque et l'insuffisance cardiaque congestive lors de son administration aux doses curatives qui sont également les doses limites de toxicité (Miller et coll. 1991. J Clin Oncol 9(1) : 17-24).

Des analogues plus récents, tels que le dexvérapamil, le PSC 833 (dérivé de la cyclosporine) et dernièrement le S9788 des Laboratoires Servier, ont fait l'objet d'essais cliniques ayant pour but de vaincre la résistance multidrogues. Cependant, ces nouveaux agents de réversion connaissent des limites d'utilisation comparables à celles reportées pour

l'ancienne génération d'agents de réversion. En effet, les essais de traitement de la résistance multidrogues à l'aide du S9788 (6- [4- [2,2-di (4-fluorophenyl)-éthylamino]-1-piperidinyl]-N,N'-di-2-propenyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine), dérivé de triazineaminopiperidine, ont caractérisé les limites d'utilisation de ce produit suite à l'apparition de phénomènes de toxicité cardiaque, d'arythmie ventriculaire et de torsade de pointe (Stupp et coll. 1998. Ann Oncol 9(11) : 1233-1242). En conséquence, le phénomène de résistance multidrogues est difficilement endigué par les agents de réversion, nouveaux et classiques, du fait de doses de traitement équivalentes aux seuils de toxicité pour le patient devenu réfractaire à la chimiothérapie.

L'immunothérapie, en particulier l'utilisation des anticorps monoclonaux, a aussi été envisagée pour traiter la résistance multidrogues apparaissant chez le patient. Elle a été testée la première fois pour inhiber la formation de tumeurs dans un cancer ovarien à l'aide de l'anticorps monoclonal MRK16 (Tsuruo. 1989. Cancer Treat Res 48 : 1811-1816). Plus récemment, l'immunothérapie monoclonalement dans le traitement de la résistance multidrogues a été approfondie par Mechetner et Roninson (1992. Proc Natl Acad Sci USA vol.89 pp.5824-5828). En effet, des anticorps monoclonaux UIC2 dirigés contre un épitope extracellulaire de la P-glycoprotéine humaine ont été obtenus et testés *in vitro* sur des lignées cellulaires résistantes aux anticancéreux. Il a alors été montré que l'effet inhibiteur, *in vitro*, des anticorps monoclonaux UIC2 est comparable à celui du vérapamil employé aux doses cliniques maximales (3 μ M). Les anticorps monoclonaux anti-P-170 exercent leur effet par une inhibition de l'activité ATPasique de la protéine P-170 ainsi que par l'inhibition de la liaison des médicaments à la protéine P-170.

Une immunothérapie appropriée, fondée sur l'injection d'anticorps monoclonaux au patient, peut avoir certains avantages dans la mesure où elle peut éliminer les cellules résistantes résiduelles d'une tumeur. Cependant, la méconnaissance de la spécificité, de la toxicité, de l'efficacité ainsi que du mécanisme d'action des anticorps limitent l'utilisation de cette approche pour vaincre la résistance multidrogues due à la surexpression de la protéine P-170. En particulier, ne sont pas maîtrisés dans l'immunothérapie monoclonalement les effets secondaires liés aux réactions immunes anti-anticorps de souris ou de lapin ainsi que les difficultés liées au défaut d'humanisation des anticorps monoclonaux.

Brève description de l'invention

La présente invention a donc pour but de proposer une stratégie alternative aux traitements déjà disponibles de la résistance multidrogues dans le cancer, en vue de remédier, au moins en partie, aux inconvénients de traitements connus de la résistance multidrogues. L'invention propose à ce titre, une immunothérapie fondée sur l'induction d'auto-anticorps polyclonaux, spécifiques de la glycoprotéine-P (Protéine P-170). Cette

immunothérapie est obtenue en utilisant la capacité antigénique, de conjugués comprenant des peptides dérivés d'au moins l'une des boucles extracellulaires de la protéine P-170, à induire des anticorps chez un patient lorsque ces peptides sont présentés et administrés sous une forme permettant ou favorisant l'expression de leur capacité antigénique, et notamment lorsqu'ils sont associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable. En particulier les anticorps sont des auto-anticorps induits contre la P-170 humaine.

L'invention concerne donc en particulier, une composition immunogène comprenant d'une part un véhicule, d'autre part en tant que structure antigénique, des conjugués comprenant tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins un peptide dérivé d'une boucle extracellulaire de la protéine P-170, chaque peptide étant associé à au moins deux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 pour, dans des conditions d'administration appropriées, permettre l'induction d'anticorps anti-P-170.

Les auteurs de la présente invention ont, de manière surprenante et inattendue, montré qu'une augmentation de 77% du temps de survie chez des souris immunisées par la composition immunogène telle que décrite dans la présente invention et après inoculation de cellules cancéreuses, suivi d'un plan de traitement chimiothérapeutique était observée.

Ces résultats sont très prometteurs puisque les meilleurs résultats publiés obtenus dans le traitement de la résistance multidrogues avec le même modèle de cancer décrivaient une augmentation de survie de 49% chez des souris traitées par une autre substance (Pierré et coll. 1992. Invest New Drug. 10 : 137-148). De plus, Yang et coll. (1999. BBRC. 266 : 167-173) ont observé, avec la même lignée cellulaire, une augmentation de survie de seulement 35% chez des souris traitées par la vincristine et la ciclosporine A.

Brève description des dessins

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée, par les figures suivantes :

- Figure 1 : représentation des peptides synthétiques correspondant aux fragments extracellulaires de la protéine P-170 de souris, couplés à quatre molécules d'acide palmitique (C16) par molécule de peptide.
- Figure 2 : schématisation de la stratégie de synthèse Boc/benzyle des peptides sur support solide.
- Figure 3 : protocole de chimiothérapie après immunisation et injection de cellules P388R chez la souris.

- 5 - Figure 4 : représentation du titre en anticorps en fonction du temps d'immunisation (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} injection) dans les sérum de souris immunisées par Lp2. Les anticorps anti-mpp1, mpp2, mpp4 ont été quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant des anticorps secondaires anti-murins spécifiques Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) respectivement. Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues pour 5 sérum de souris saignées 12 jours après une immunisation. Une unité correspond à 0,2µg Ig/ml.
- 10 - Figure 5 : représentation du titre en anticorps en fonction du temps d'immunisation (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} injection) dans les sérum de souris immunisées par Lp4. Les anticorps anti-mpp1, mpp2, mpp4 ont été quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant des anticorps secondaires anti-murins spécifiques Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) respectivement. Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues pour 5 sérum de souris saignées 12 jours après une immunisation. Une unité correspond à 0,2µg Ig/ml.
- 15 - Figure 6 : représentation du titre en anticorps en fonction du temps d'immunisation (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} injection) dans les sérum de souris immunisées par Lp3. Les anticorps anti-mpp1, mpp2, mpp4 ont été quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant des anticorps secondaires anti-murins spécifiques Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) respectivement. Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues pour 5 sérum de souris saignées 12 jours après une immunisation. Une unité correspond à 0,2µg Ig/ml.
- 20 - Figure 7 : représentation du titre en anticorps en fonction du temps d'immunisation (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} injection) dans les sérum de souris immunisées par Lp1. Les anticorps anti-mpp1, mpp2, mpp4 ont été quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant des anticorps secondaires anti-murins spécifiques Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) respectivement. Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues pour 5 sérum de souris saignées 12 jours après une immunisation. Une unité correspond à 0,2µg Ig/ml.
- 25 - Figure 8 : Temps de survie des souris immunisées par Lp1 et Lp2. Au temps 0, 10^6 P388R cellules chimiorésistantes ont été inoculées. Aux jours 1, 10 et 22, 5,5mg/kg de doxorubicine et aux jours 4 et 14, 2'5mg/kg de vinblastine ont été injectés.

Modes de réalisation de l'invention

45 La glycoprotéine-P ou protéine P-170 est une phospho-glycoprotéine membranaire de 170 kDa identifiée par Julian et Ling (1976. Biochim Biophys Acta 455(1) : 152-162). La protéine P-170 murine est constituée de

1276 acides amines formant deux moitiés équivalentes. Les domaines hydrophobes de la molécule sont numérotés de 1 à 12 et sont impliqués dans le flux sortant de drogues chimiothérapeutiques. Les boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la protéine P-170 murine ont été retenues pour leur topologie extracellulaire prononcée préjugeant de leur caractère antigénique. De manière équivalente, la protéine P-170 humaine (Chen et al. 1986 Cell. 47(3) : 381-389) est une protéine de 1280 acides aminés constituée de deux domaines homologues comprenant chacun six domaines en hélice transmembranaires ainsi qu'un site de liaison nucléotidique. Les régions hydrophobes de ces domaines transmembranaires forment des boucles extracellulaires considérées comme les fragments de reconnaissance de la protéine P-170 depuis l'extérieur de la cellule. Les boucles extracellulaires 1, 4 et 6 de la protéine P-170 humaine ont aussi été retenues comme ayant un pouvoir antigénique élevé du fait de leurs situations extracellulaires particulièrement marquées.

L'immunothérapie mise en œuvre dans le cadre de l'invention complète la thérapie chimique du cancer pour permettre aux effets traitants des drogues chimiothérapeutiques de se manifester.

Conformément à l'acceptation usuelle dans le cadre de l'invention, le « cancer » se définit par deux caractéristiques principales : la croissance et la prolifération cellulaire non régulées par des signaux externes et la capacité d'envahir les tissus ainsi que, le cas échéant, la capacité de former des métastases en colonisant des sites à distance.

Ces caractéristiques sont la conséquence des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses, c'est-à-dire de leur instabilité caryotypique et génomique, de leur prolifération incontrôlée, de leur pouvoir métastatique s'accompagnant de l'acquisition de nouveaux phénotypes ainsi que de l'activation et de la dérépression d'oncogènes dans lesdites cellules cancéreuses. On entend donc par « cancer » dans le cadre de la présente invention toute phase de la croissance ou de la prolifération cellulaire ayant les caractéristiques ci-dessus, évoluant notamment vers le développement de tumeurs primaires et/ou de tumeurs métastatiques (tumeurs secondaires).

De plus, au sens de la présente invention, on entend par « traitement de la résistance multidrogues » l'ensemble des soins médicaux destinés à combattre la résistance multidrogues pour en limiter les conséquences, éviter la mort et de préférence rétablir une sensibilité aux médicaments anticancéreux. A ce titre, l'objectif du traitement de la résistance multidrogues est idéalement à visée curative de la résistance multidrogues, en induisant une réversion complète vers un phénotype cellulaire sensible à la chimiothérapie. Cette réversion peut néanmoins être partielle : dès lors, le traitement de la résistance multidrogues va s'avérer palliatif permettant une rémission prolongée du patient. Le traitement de la résistance multidrogues se caractérise également par son pouvoir

prophylactique permettant de prévenir l'apparition de résistances multidrogues de novo ou acquise, chez le patient.

L'invention concerne donc en particulier, une composition immunogène comprenant d'une part un véhicule, d'autre part en tant que structure antigénique, des conjugués comprenant tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins un peptide dérivé d'une boucle extracellulaire de la protéine P-170, chaque peptide étant associé à au moins deux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 pour, dans des conditions d'administration appropriées, permettre l'induction d'anticorps anti-P-170.

Dans le cadre de la présente invention, la composition immunogène permet également l'induction d'anticorps anti-P-170 pour la réversion de la résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer.

Dans un mode de réalisation préféré, les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins deux boucles, de préférence d'au moins trois boucles extracellulaires de la protéine P-170.

L'expression « conjugué » correspond, selon l'invention, à un réactif formé par liaison covalente entre des molécules d'acides gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 et des séquences d'acides aminés telles que décrites dans la présente invention, pour former une molécule mixte lipido-peptidique. La séquence peptidique, obtenue notamment par synthèse en phase solide, est couplée de manière covalente aux molécules d'acides gras constituant la région lipidique de la molécule.

Au sens de la présente invention, le terme « peptide dérivé » de la protéine P-170 désigne tout ou partie de la séquence d'acides aminés composant chaque boucle extracellulaire de la protéine P-170, dès lors que ledit « peptide dérivé » possède au moins un épitope de la boucle extracellulaire dont il dérive. Un peptide dérivé d'une boucle extracellulaire a avantageusement entre 5 et 50 résidus d'acides aminés, de préférence entre 5 et 40, ou entre 10 et 30, avantageusement entre 10 et 25 résidus. Entrent dans le cadre de cette définition, (1) des peptides dont la séquence d'acides aminés est identique à la séquence correspondante de la boucle extracellulaire dont ils dériven ou (2) des peptides dont la séquence d'acides aminés est modifiée par rapport à la séquence de la boucle extracellulaire dont ils dériven, ladite modification pouvant consister en une mutation ponctuelle par insertion, délétion ou substitution, en particulier substitution conservatrice, d'un ou plusieurs résidus dès lors que le peptide ainsi constitué reste porteur d'épitope de la protéine P-170. En particulier une mutation acceptable est une mutation qui ne perturbe pas la conformation du peptide modifié lorsqu'il est inclus dans la composition de l'invention. Ceci peut être vérifié par la capacité du peptide modifié à induire des anticorps lorsqu'il est formulé dans une composition conformément à l'invention.

Les peptides de l'invention sont obtenus de préférence par synthèse chimique, en particulier par mise en œuvre des méthodes décrites ci-après.

Dans le contexte de l'invention, l'expression « boucle extracellulaire » de la glycoprotéine-P (ou Protéine P-170) désigne chaque séquence d'acides aminés de la protéine P-170 ayant une topologie extracellulaire ou une relation significative avec le milieu extracellulaire pour pouvoir être sélectionnée en tant que séquence porteuse d'épitope de cette protéine.

Les séquences d'acides aminés formant les peptides synthétiques utilisés dans le cadre de l'invention peuvent être en tant que telles antigéniques, ou être antigéniques dès lors qu'elles sont présentées dans une conformation telle qu'elles conservent la conformation de la séquence d'acides aminés qui leur correspond dans la boucle extracellulaire dont dérive le peptide, ou une conformation suffisamment similaire pour conférer au peptide formé une capacité à induire la production d'anticorps dans des conditions d'administration appropriées. La capacité à induire la production d'anticorps pourra par exemple être vérifiée chez la souris immunisée avec les peptides préparés dans le cadre de l'invention ou par tout autre moyen connu. Ainsi les peptides de l'invention ont avantageusement, dans la composition immunogène, une conformation tridimensionnelle telle qu'elle reproduit la conformation de la partie de boucle extracellulaire dont dérive le peptide, ou qu'elle est suffisamment similaire à cette dernière, pour conférer à la composition formée, sa capacité immunogène. La présentation appropriée des peptides résulte avantageusement de leur association avec les autres constituants de la composition immunogène.

Cette faculté à induire la production d'anticorps est en particulier obtenue lorsque les peptides de l'invention sont des peptides synthétisés et modifiés pour se présenter sous la forme de conjugués, associés à un véhicule approprié, en particulier des liposomes.

Les conjugués selon l'invention correspondent aux structures antigéniques transportées par le véhicule dans la composition immunogène. Dans le contexte de l'invention, l'expression « structure antigénique » désigne des molécules capables de réagir avec des anticorps pour former des complexes antigène/anticorps. Ladite « structure antigénique » de la composition immunogène a, ou non, en tant que telle la capacité d'induire un phénomène d'immunogénérité correspondant à la formation d'anticorps spécifiques d'un antigène donné.

A titre d'exemples, ces conjugués, comprennent des peptides dérivés de la boucle extracellulaire 1 (mpp1), et d'au moins une des boucles extracellulaires 2 (mpp2) ou 4 (mpp4) de la protéine P-170 murine, caractérisées par leur séquence, leur masse moléculaire et leur pureté après synthèse selon le protocole expérimental décrit ci-après dans le tableau I.

Tableau I :

Nom des conjugués	Séquence en acides aminés	Masse moléculaire calculée	Masse moléculaire observée	Pureté (%)
mpp1 SEQ	K-G-GNMTDSFTKAEASILPSITNQ	5436	5437	91.6

ID NO 1	SGPNSTLIISNSSLEEE-G-K-K-NH ₂			
mpp2 SEQ ID NO 2	K-G-KVLTSFTNKELAYAK-G-K-K-NH ₂	3293	3293	93.8
mpp4 SEQ ID NO 3	K-G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-K-NH ₂	3190	3188	95.3

Les masses moléculaires calculées et observées des peptides dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la protéine P-170 murine ont été obtenues par analysé par spectrométrie de masse soit :

- [M+H+] pour la masse moléculaire calculée,
- MALDI-TOF et PDMS-TOF pour la masse moléculaire mesurée, i.e. (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization – Time of Flight) (Plasma Desorption Mass Spectrometry – Time of Flight).

De plus les séquences en acides aminés sont également analysées par hydrolyse des aliquots dans HCl 6N/phénol à 110°C afin de vérifier le nombre d'acides aminés attendu et obtenu (attendu/obtenu) :

mpp 1, A (2/1.5), D (5/4.4), E (5/6.6), F (1/0.6), G (4/3.4), I (4/3.6), K (4/4.0), L(3/3.5), M (1/0.7), P (2/1.8), T (4/3.0), S (8/7.4).

mpp 2, A (2/2.3), D (1/1.2), E (2/2.4), F (1/1.0), G (2/2.1), K (6/6.0), L (2/2.1), S (1/0.9), V (1/1.0), Y (1/1.0).

mpp 4, D (5/5.0), E (3/3.1), G (2/2.0), K (4/3.7), S (1/0.9), R (2/1.9).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, les conjugués comprennent des peptides dérivés de la boucle extracellulaire 1 (hpp1) (hpp : human palmitoyl peptide) et d'au moins une des boucles extracellulaires 4 (hpp4) et 6 (hpp6) de la protéine P-170 humaine. Les peptides des conjugués comprennent donc des séquences d'acides aminés dérivées des boucles extracellulaires 1(hpp1) et 4 (hpp4) ou des boucles extracellulaires 1 (hpp1) et 6 (hpp6).

De préférence, les conjugués de la composition immunogène comprennent des peptides dérivés des trois boucles 1 (hpp1), 4 (hpp4) et 6 (hpp6) de la protéine P-170 humaine.

Etant donné la longueur de 47 acides aminés de la boucle 1 de la protéine P-170, des peptides dérivés de cette boucle peuvent résulter de la division en trois fragments de ladite boucle 1, obtenus par coupure au niveau des sites de glycosylation. Les trois peptides dérivés donnent lieu aux trois conjugués suivants hpp1a, hpp1b et hpp1c dont on peut réaliser la synthèse. D'autres peptides peuvent être des fragments de ces trois peptides, contenant un ou plusieurs épitopes. Dès lors, les conjugués selon la présente invention comprennent donc tout ou partie des peptides dérivés de la boucle extracellulaire 1 de la protéine P-170 humaine correspondant aux trois peptides résultant de la coupure de ladite boucle 1 au niveau des sites de glycosylation.

Les séquences peptidiques des conjugués sont utilisables en tant que telles pour la préparation de compositions immunogènes selon l'invention en particulier en association avec des liposomes. Les peptides

de ces conjugués sont respectivement choisis parmi les séquences d'acides aminés suivantes :

- pour la boucle 1 (SEQ ID NO 4):
GEMTDIFANAGNLEDLLMSNITNRSDINDTGFFMNLE
EDMTRYAYYS
- pour la boucle 1a (SEQ ID NO 5): GEMTDIFANAGNLEDLLMS
- pour la boucle 1b (SEQ ID NO 6) : NITNRSDINDTGFF
- pour la boucle 1c (SEQ ID NO 7): MNLEEDMTRYAYYS
- pour la boucle 4 (SEQ ID NO 8): FSRIIGVFTRIDDPETKRQNSNLFS
- pour la boucle 4a (SEQ ID NO 9) : FTRIDDPETKRQNSNLFS
- pour la boucle 6 (SEQ ID NO 10): FRFGAYLVAHKLMSFED

et/ou leur combinaison.

Pour la boucle extracellulaire 1, on utilisera avantageusement les trois peptides 1a, 1b et 1c dans une même composition. Alternativement les peptides 1a et 1b ou 1a et 1c ou 1b et 1c seront mis en œuvre.

Le tableau II récapitule les séquences en acides aminés des conjugués correspondant aux boucles extracellulaires 1, 4 et 6 de la protéine P-170 humaine. Les séquences en acides aminés correspondant aux séquences des peptides dérivés sont en grandes lettres alors que les petites lettres correspondent aux acides aminés ajoutés sur lesquels les molécules d'acide gras sont couplées.

La séquence, la masse moléculaire et la pureté des peptides décrits dans le tableau II peuvent être contrôlées par les techniques décrites ci-dessus pour les peptides du Tableau I.

Un peptide dérivé d'une boucle extracellulaire a avantageusement une pureté égale ou supérieure à 90%, avantageusement comprise entre 91% et 98%, mesurée en chromatographie HPLC après la synthèse.

Tableau II :

Nom des conjugués	Séquence en acides aminés de la P-170 humaine
Hpp1 (SEQ ID NO 11)	K-G-GEMTDIFANAGNLEDLLMSNITNRSDINDTGFFMNLE EDMTRYAYYS-G-K-K-NH ₂
Hpp1a (SEQ ID NO 12)	K-G-GEMTDIFANAGNLEDLLMS-G-K-K-NH ₂
Hpp1b (SEQ ID NO 13)	K-G-NITNRSDINDTGFF-G-K-K-NH ₂
Hpp1c (SEQ ID NO 14)	K-G-MNLEEDMTRYAYYS-G-K-K-NH ₂
Hpp4 (SEQ ID NO 15)	K-G-FSRIIGVFTRIDDPETKRQNSNLFS-G-K-K-NH ₂
Hpp4a (SEQ ID NO 16)	K-G-FTRIDDPETKRQNSNLFS-G-K-K-NH ₂
Hpp6 (SEQ ID NO 17)	K-G-FRFGAYLVAHKLMSFED-G-K-K-NH ₂

5 Dans le cadre de la présente invention, les séquences d'acides aminés correspondant aux séquences des boucles extracellulaires (représentées en grandes lettres) peuvent être allongées notamment à leur(s) extrémité(s) au moyen de résidus d'acides aminés (représentés dans les peptides illustrés ci-après en petites lettres majuscules) sur lesquels les résidus d'acides gras sont couplés. Différentes séquences de conjugués de l'invention couplant séquences d'acides aminés et molécules d'acide gras sont représentées sous cette forme dans les tableaux qui suivent.

10 10

15 Avantageusement, les molécules d'acide gras de chaîne carbonée C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23 ou C24 sont de préférence des molécules d'acide palmitique en C16. Les chaînes carbonées des molécules d'acide gras comprises entre C12 et C24 sont linéaires ou ramifiées. De préférence, les molécules d'acide gras ont des chaînes carbonées linéaires. En revanche, les molécules d'acide gras ne peuvent être ni monoinsaturées ni polyinsaturées en raison d'incompatibilité réactionnelle lors de la synthèse peptidique en particulier 20 durant la dernière étape de déprotection en présence d'acide fort.

25 De façon préférée, chaque conjugué comprend au moins quatre molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24, les molécules d'acides gras étant, de préférence également réparties aux extrémités N- et C- terminales des peptides. Selon les acides gras d'autres 30 répartitions peuvent être envisagées y compris dans l'intérieur de la séquence d'acides aminés. Ces peptides sont également couplés de façon covalente aux molécules d'acide gras.

35 Préférentiellement, les peptides, dans les conjugués, sont chacun couplés à quatre molécules d'acide palmitique, ils sont donc tétrapalmitoylés.

40 De préférence deux molécules d'acide palmitique sont couplées à l'extrémité N-terminale et deux molécules d'acide palmitique sont couplées à l'extrémité C-terminale du peptide.

45 De façon préférée et comme illustrée au tableau II, les séquences d'acides aminés des boucles extracellulaires des peptides des conjugués sont allongées en position N- et/ou C-terminale par un ou plusieurs résidus d'acides aminés pour permettre l'association aux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24.

L'association desdits peptides aux acides gras peut être réalisée exclusivement en position N-terminale ou alternativement exclusivement en position C-terminale. Avantageusement, dans les conjugués, l'association des peptides aux acides gras est réalisée en position N-terminale et C-terminale des séquences peptidiques, en particulier pour donner des séquences tétrapalmitoylées.

Alternativement ou cumulativement, on peut envisager d'associer des acides gras à des résidus internes dans la séquence peptidique.

Les conjugués tels que définis dans la présente invention peuvent également comprendre en outre une ou plusieurs molécules de PEG.

La « pégylation », c'est à dire le procédé qui consiste à coupler de manière covalente une molécule de PEG à un peptide, pour augmenter l'immunogénicité / le caractère immunogène d'un peptide utilisé comme antigène est une technique bien connue de l'homme du métier (2002. *Adv Drug Deliv Rev.* 54(4): 459-476).

Ce procédé permet, notamment, d'augmenter l'accessibilité de la séquence peptidique et par ce biais la présentation de l'antigène.

De manière générale, plus la séquence peptidique est longue, plus le nombre de molécules de PEG sera élevé.

Avantageusement, la ou les molécules de PEG, de 1 à 8000, sont liées aux résidus lysine (K) se trouvant en position N- et/ou C-terminale des séquences d'acides aminés des boucles extracellulaire des peptides des conjugués tels que décrits dans la présente invention. Chaque peptide étant lié de manière covalente à au moins deux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 ou à au moins deux chaînes de Polyethylene Glycol, (1-8000) qui sont couplées chacune à une molécule de Phosphatidyl Ethanol Amine afin de permettre de reconstituer ces complexes antigeniques dans la bicouche lipidique des liposomes. Dans des conditions d'administration appropriées, ces antigènes reconstitués dans des liposomes-adjuvants, l'induction d'anticorps anti-P-170.

Dans le contexte de l'invention, l'expression « véhicule » d'une composition immunogène désigne tout agent assurant le transport des structures antigéniques dans le système immunitaire. En particulier, un véhicule conforme à l'invention pourra être constitué de liposomes, de protéines membranaires bactériennes telles que les OMPC de *Neisseria meningitidis*, TraT d'*Escherichia coli*, de protéines Omp d'entérobactéries, de nanoparticules, de miscelles, de particules d'or, de microbilles et de virosomes.

Pour former les compositions immunogènes de l'invention à partir des susdits conjugués, on choisit avantageusement les liposomes comme véhicule pour présenter les conjugués dans la composition de la présente invention.

Avantageusement, lesdits conjugués sont présents à la surface des liposomes.

On entend par « liposomes » au sens de la présente invention une particule sphérique artificielle constituée d'une ou plusieurs couches de phospholipides, assurant la présentation aux cellules du système immunitaire des peptides porteurs des épitopes et dérivés des boucles extracellulaires de la glycoprotéine-P (P-170).

La composition selon la présente invention comprend avantageusement les conjugués et les liposomes dans un rapport molaire compris entre 1/10 et 1/1000, de préférence entre 1/50 et 1/500, avantageusement dans un rapport molaire de 1/250.

5 Avantageusement, les liposomes sont préparés en mélangeant le dimyristoylphosphatidylcholine (DPMC), le dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) et le cholestérol dans un rapport molaire respectivement de 0.9 : 0.1 : 0.7. Les produits utilisés supra sont de préférence d'origine synthétique afin d'éviter les possibilités de contamination par des endotoxines, prions ou virus. Par exemple, les phospholipides DMPC et DMPG sont d'origine synthétique (Avanti Polar Lipids USA) et le cholestérol, de pureté à 98%, est d'origine animale. Le monophosphoryl lipide A (MPLA), également d'origine synthétique, et connu pour accroître la réponse immunitaire (Fries et coll. 1992. Proc Natl Acad Sci 89(1) : 358-10 362) a été ajouté et testé à des liposomes dans une concentration de 40µg 15 par µmole de phospholipides.

10 La composition selon la présente invention comprend en outre au moins un adjuvant. Le terme « adjuvant » est utilisé dans le contexte de la présente invention pour désigner un produit permettant un stimuli non spécifique des réponses immunes et augmentant l'antigénicité des structures antigéniques. L'adjuvant agirait en mobilisant les cellules phagocytaires vers le lieu de dépôt des structures antigéniques et en assurant un relargage plus lent des antigènes, ce qui prolonge la 15 stimulation du système immunitaire.

20 25 En particulier, les adjuvants utilisés dans la présente composition immunogène sont choisis dans le groupe consistant en Alum, phosphate de calcium, interleukine 1, monophosphoryl lipide A (MPLA) et/ou microcapsules de protéines et de polysaccharides. Avantageusement, l'Alum est l'adjuvant utilisé dans le cadre de la présente invention.

30 35 De telles compositions immunogènes sont préparées sous la forme de solutions liquides, ou de suspensions injectables, ou encore sous une forme solide adaptée à la mise en solution préalable à l'injection dans le cadre, par exemple, d'un kit d'exploitation de la présente composition tel que décrit plus loin.

40 45 L'invention porte également sur des peptides dérivés d'au moins une boucle extracellulaire de la protéine P-170 et permettant l'induction d'anticorps anti-P-170 lorsqu'ils sont utilisés dans les compositions immunogènes telles que décrites. Ces peptides sont respectivement choisis parmi les séquences d'acides aminés suivantes : SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 17.

Egalement comprises dans la présente invention sont les séquences d'acides nucléiques, ADN ou RNA, codant pour les peptides tels que décrits supra.

5 La présente invention concerne non seulement la composition immunogène considérée en tant que telle et définie supra, mais également une méthode de préparation de cette composition.

10 Les résultats expérimentaux ci-après montrent que l'association de peptides particuliers à uniquement deux molécules d'acide palmitique peut ne pas conduire à l'expression d'une réponse immunogène. Ceci traduit la nécessité de sélectionner les acides gras pour conférer aux conjugués formés, la conformation nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire.

15 Une attention particulière est également apportée à la synthèse des conjugués selon l'invention et en particulier à leur région peptidique. En effet, les travaux précédents de Tosi et coll. (1995) ont mis en évidence que la séquence peptidique de mpp1, qui est le plus long des conjugués avec 43 acides aminés, ne permettait pas l'obtention d'une réponse immunitaire. En l'absence d'explications et d'hypothèses de travail sur ce constat, les inventeurs ont révélé, dans le cadre de la présente invention, le rôle essentiel d'une synthèse peptidique très précise. Les inventeurs ont donc développé et montré qu'une méthode de synthèse améliorée permettant une production plus efficace de certains acides aminés en évitant leur implication dans des réactions de terminaison précoce permettait d'obtenir en particulier une séquence mpp1 immunoréactive. Les conjugués selon l'invention peuvent donc être obtenus sous une forme appropriée pour réaliser la composition immunogène de l'invention par une synthèse sur support solide selon la stratégie Boc/benzyle.

20 En l'espèce comme décrit dans la partie exemples, les peptides correspondant aux séquences des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-170 murine ont donc été synthétisés par un synthétiseur de peptide « Applied Biosystems 430A » utilisant le tertiobutyloxycarbonyl/benzyl ou stratégie Boc/benzyle et *in situ* une activation par le (N-[(1H – benzotriazol – 1 – yl) (diméthylamino) méthylène] – N – méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxyde.

25 35 La synthèse des peptides peut être réalisée sur un synthétiseur de peptides, par exemple un synthétiseur « Applied Biosystem 430A » en utilisant le (13,14) tertiobutyloxycarbonyl/benzyl et *in situ* une activation par le (N- [(1H – benzotriazol – 1 – yl) (diméthylamino) méthylène] – N – méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxyde (Schölzer M. et al Science 1992, 256 (5054) : 221-225).

40 45 Selon cette méthode, la synthèse des conjugués repose sur la synthèse des séquences d'acides aminés des boucles extracellulaires des peptides des conjugués sur support solide selon la stratégie Boc/benzyle, puis un allongement en position N- et/ou C-terminale par un ou plusieurs

ré sidus d'acides aminés pour permettre l'association aux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24, suivi d'une étape de déprotection des fonctions amines des lysines N et C-terminales afin de les coupler avec les acides gras à chaîne carbonée comprise entre C12 et C24. L'étape finale est le clivage par un acide fort, tel que l'acide fluorhydrique anhydre, des conjugués synthétisés sur support solide, tel qu'une résine.

Cette méthode de synthèse améliorée permet une production plus efficace de certains acides aminés en évitant leur implication dans des réactions de terminaison précoce.

L'association desdits peptides aux acides gras peut être réalisée soit en position N-terminale ou alternativement soit en position C-terminale.

Avantageusement, dans les conjugués, l'association des peptides aux acides gras est réalisée en position N-terminale et C-terminale des séquences peptidiques, en particulier pour donner des séquences tétrapalmitoylées.

Alternativement ou cumulativement, on peut envisager d'associer des acides gras à des résidus internes dans la séquence peptidique.

Chaque peptide de la composition immunogène peut être associé à plusieurs molécules d'acide gras par le biais d'une ou de plusieurs molécules de PEG.

Les conjugués obtenus sont ensuite présentés à la surface des liposomes.

Optionnellement, les conjugués une fois synthétisés sont purifiés, par exemple par RP-HPLC ou chromatographie liquide à haute performance à polarité de phase inversée. Cette étape de purification est rendue délicate en raison de la présence de chaîne lipidique qui entraîne un élargissement des pics chromatographiques et des problèmes de solubilité. L'isolement du produit attendu, des impuretés formées lors de l'elongation du peptide peut être délicat et conduire à des rendements faibles. En outre, la purification peut être difficile dans la mesure où l'acide gras est situé en position C-terminale. En effet, dans ce cas le produit désiré mais aussi les impuretés portent la partie lipophile à l'origine des difficultés chromatographiques. De plus, comme cette stratégie fait intervenir en fin de synthèse une étape de coupure et de déprotection en milieu fort, ce traitement limite le choix de la partie lipophile (Deprez et coll. 1996. Vaccine 14(5) : 375-382 ; Stöber et coll. (1997) Bioorg. Med. Chem. 5(1) : 75-83).

La présentation à la surface des liposomes des conjugués obtenus est ensuite obtenue de manière mécanique. En effet, les conjugués

mélangés aux liposomes s'enchassent au sein de la membrane phospholipidique des liposomes à l'aide de leurs doubles chaînes lipidiques.

5 La présente invention concerne également la mise en œuvre de cette composition dans des méthodes d'immunisation selon l'invention.

La présente invention porte donc sur une méthode d'immunisation comprenant une première administration, notamment par injection de la composition immunogène selon l'invention, et une administration de rappel de ladite composition (ou booster) par exemple de deux injections successives. Les injections de rappel, exposant plusieurs fois le même antigène, induisent une réponse immunitaire secondaire forte. L'exposition répétée de peptides dérivés des boucles extracellulaires de la protéine P-170 auprès du système immunitaire induit une mémoire immunologique ainsi que des réponses secondaires ultérieures rapides et élevées en titre d'anticorps.

Plus particulièrement, dans la présente méthode d'immunisation les injections chez l'humain sont réalisées à 1 mois d'intervalle.

20 Selon un mode de réalisation, l'immunisation par la composition selon l'invention peut être mise en œuvre de manière concomitante ou précédent un traitement anticancéreux administré à un patient.

25 De préférence, l'immunisation précède le traitement de chimiothérapie afin de prévenir et anticiper l'apparition d'un phénotype de résistance multidrogues chez le patient. Ce plan de traitement sera préféré à une immunisation concomitante aux traitements chimiothérapeutiques lorsque le diagnostic et l'évolution du cancer permettent une prise en charge thérapeutique curative (chimiothérapie) décalée d'au moins 30 jours à compter de la date de diagnostic. Une prise en charge tardive du cancer n'empêche pas l'utilisation de la méthode d'immunisation par la composition de la présente invention. En effet, l'association dans le même temps du traitement anticancéreux et de l'immunisation par ladite composition immunogène induit néanmoins une réponse immunitaire pour la production d'auto-anticorps anti-P-170 ayant un effet curatif ou palliatif sur l'apparition du phénotype de résistance multidrogues. L'effet curatif de l'immunisation par la présente composition s'illustre par une réversion du phénotype de résistance multidrogues. Dans le contexte de l'invention, l'expression « réversion » du phénotype de résistance multidrogues désigne le passage d'un phénotype de résistance multidrogues à un phénotype dit sensible aux traitements chimiothérapeutiques.

40 Par « chimiothérapie », « anticancéreux » ou « drogues chimiothérapeutiques », l'on entend au sens de la présente invention, tout traitement curatif ou palliatif de tumeurs primaires ou secondaires à base d'agents cytotoxiques. La chimiothérapie requiert généralement plusieurs cycles de traitement.

45 Dans le cadre d'une méthode d'immunisation précédent le traitement de chimiothérapie, la mise en œuvre de la première injection de la

composition selon la présente invention précède d'au moins 60 jours, de préférence 63 et 67 jours, le début du traitement chimiothérapeutique.

Les compositions selon l'invention sont administrables par voie topique, par voie systémique (orale, nasale et autres voies muqueuses) et/ou par voie parentérale (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire ou intra-péritonéale) ou par combinaison de ces voies et induisent effectivement un réponse immunitaire protectrice contre la résistance multidrogues. La composition est formulée de manière à permettre une administration aisée par les diverses voies ci-dessus. En particulier, le choix des composés auxiliaires (agent mouillant, émulsifiant ou tampon) est dicté par le mode d'administration choisi.

Avantageusement, l'immunisation est réalisée grâce à une administration par voie intramusculaire et intra-péritonéale respectivement chez l'homme et chez la souris.

Un des objets de la présente invention concerne également la mise à disposition d'un anticorps, en particulier un auto-anticorps, induit contre la P-170 humaine ou murine, qui se lie de façon spécifique aux peptides des conjugués selon l'invention.

Cet anticorps peut être un anticorps polyclonal ou monoclonal, sélectionné parmi le groupe comprenant les isotypes IgG1, IgG2, IgG3 et un IgM. En particulier l'anticorps Ig2 peut être du sous type 2a ou 2b.

La présente invention porte en outre sur une composition immunogène comprenant d'une part un véhicule et d'autre part des conjugués comprenant au moins un peptide dérivé de la boucle extracellulaire 1 de la protéine P-170 permettant l'induction d'anticorps antimpp1, chaque peptide étant associé à plusieurs molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 lesdits conjugués présentant tout ou partie de la conformation de la boucle extracellulaire 1 de la protéine P-170, pour la réversion de la résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer.

Cette composition est particulièrement adaptée aux traitements des tumeurs solides exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine.

La présente invention concerne également l'utilisation de la composition immunogène selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné au traitement et/ou la prévention d'une résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer. Le cancer tel qu'envisagé sera un cancer du rein, du foie, du colon, de l'intestin, de la prostate, du sein, de la vessie, du cerveau, du sang (leucémie) et/ou des tissus mésenchymateux (myélome). Il pourra également être une tumeur solide exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine. L'utilisation de la composition immunogène pourra aussi se faire en association avec un traitement anticancéreux.

En particulier, il est prévu lors des phases cliniques I/II d'utiliser le présent vaccin chez des patients porteurs de tumeurs solides, en particulier les cancers exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine, de type cancer du rein, du foie, du colon, de l'intestin, de la prostate, du sein, de la vessie, du cerveau, du sang (leucémie) et/ou des tissus méduaires (myélome). Les patients choisis pour cette étude clinique seront sélectionnés sur des critères de non-immunodépression et de tolérance à un traitement standard. Parallèlement à ces essais, sera effectuée une étude pharmacodynamique et de tolérance chez ces mêmes patients.

Enfin, la composition selon la présente invention sera utilisée directement chez des patients exprimant spontanément une résistance multidrogues afin d'évaluer cliniquement chez l'homme le taux de réversion du phénotype de résistance multidrogues.

La présente invention comprend également une méthode de traitement et/ou de prévention d'une résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer, en particulier un cancer atteignant le rein, le foie, le colon, l'intestin, la prostate, le sein, la vessie, le cerveau, le sang (leucémie) et/ou les tissus méduaires (myélome) comprenant l'administration de la composition immunogène telle que décrite.

Le cancer particulièrement visé par le traitement tel que décrit est une tumeur solide exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine.

Finalement, un kit d'exploitation de la composition immunogène comprenant la composition immunogène selon l'invention et, optionnellement, des réactifs et/ou des instructions d'utilisation est également envisagé.

35

Exemples

I-1 Préparation des conjugués formés par liaison covalente entre la région peptidique et les molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24.

La synthèse des peptides peut être réalisée sur un synthétiseur de peptides, par exemple un synthétiseur « Applied Biosystem 430A » en utilisant le (13,14) tertiobutyloxycarbonyl/benzyl et *in situ* une activation par le (N- [(1H – benzotriazol – 1 – yl) (diméthylamino) méthylène] – N – méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxyde (Schölzer M. et al Science 1992, 256 (5054) : 221-225), puis couplés de façon covalente avec quatre molécules d'acides palmitique par molécule de peptide (figure 1).

Une méthode de synthèse améliorée permettant une production plus efficace de certains acides aminés en évitant leur implication dans des réactions de terminaison précoce a été développée. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de mpp1 du fait de sa longueur (43 acides aminés). Les peptides murins mpp1, mpp2 et mpp4 ont notamment été synthétisés et les résultats de la synthèse (analyse de la séquence des peptides, masse moléculaire, et pureté) ont été rapportés au Tableau 1 *supra*, chaque peptide ayant été contrôlé pour sa séquence par analyse des acides aminés après hydrolyse acide totale, pour sa masse moléculaire par analyse de spectrométrie de masse et pour sa pureté par HPLC.

Selon cette méthode, la synthèse des conjugués repose sur l'élaboration sur résine de la séquence peptidique voulue, puis la déprotection des fonctions amines des lysines N et C-terminales afin de les coupler avec les acides gras à chaîne carbonée comprise entre C12 et C24. L'étape finale est le clivage par l'acide fluorhydrique anhydre. Les conjugués ont été obtenus en utilisant la stratégie Boc/benzyle. L'approche optimale consiste à élaborer la séquence peptidique sur la phase solide puis à coupler un acide gras activé sur une fonction amine (ou thiol) déprotégée sélectivement. Si l'acide gras est introduit à l'extrémité N-terminale, le peptide ne nécessite pas d'aménagements fonctionnels particuliers. Par contre l'introduction de l'acide gras en position C-terminale s'effectue en général sur la fonction amino ε d'une chaîne latérale de lysine. En stratégie Boc/benzyle, il est nécessaire d'introduire l'acide aminé Boc-L-Lys(Fmoc)-OH lors de la synthèse du peptide. Après avoir élaboré toute la séquence, la fonction amino est déprotégée puis acylée avec l'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24. Le conjugué est enfin déprotégé et coupé de la résine en présence d'un acide fort, l'acide fluorhydrique anhydrique (Figure 2).

I-2 Evaluation du degré d'immunogénicité des peptides couplés à deux ou quatre acides gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24

Afin de progresser dans la compréhension du degré d'immunogénicité des conjugués selon l'invention, deux types de conjugués ont été fabriqués et testés. Le premier type de conjugués correspond aux séquences synthétiques des peptides dérivés des boucles extracellulaires de la protéine P-170 murine, couplées de façon covalente à quatre molécules d'acide gras, par molécule de peptide, de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24. Le second type de conjugués est formé d'un peptide couplé seulement à deux molécules d'acide gras. Cette étude est illustrée à l'aide d'un exemple spécifique de conjugués dipalmitoylés et tétrapalmitoylés.

Le tableau III décrit les séquences des conjugués di- et tétrapalmitoylés correspondant aux boucles 1, 2 et 4 de la protéine P-170 murine ainsi que leur capacité immunogène mesurée à l'aide de la détection des anticorps par la technique de Dot Blot ainsi que le titre en

anticorps par unités de fluorescence. On observe que les souris ayant reçu des liposomes contenant des conjugués avec deux résidus palmityls ne montrent pas de réponse immunitaire à l'exception du mpp'4, correspondant à la boucle 4 de la protéine P-170 murine. Le titre en anticorps induit par ce conjugué est toutefois quatre fois inférieur au titre induit par mpp4, soit la même séquence couplée à quatre résidus palmityls. Les conjugués mpp4 et mpp2 engendrent une réponse immunitaire avec un titre en anticorps proche de 400 unités de fluorescence. Dans le cadre de la première synthèse peptidique aucun anticorps n'a été détecté suite à l'injection du conjugué mpp1 correspondant à la séquence acide aminé la plus longue, ce qui pouvait résulter de la synthèse peptidique. En effet, la synthèse de cette boucle est très dure et longue puisqu'il existe de nombreuses terminaisons chimiques possibles, ou de repontage chimique ce qui pourrait expliquer le manque de réponse immunitaire de ce premier lot de peptides. Pour les essais de vaccination des animaux, il a donc été procédé à une nouvelle synthèse des peptides, notamment de la boucle 1.

Au vu de ces résultats, le modèle couplant chaque molécule de peptides à quatre molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 renforce la capacité immunogène desdits conjugués incorporés dans la membrane des liposomes dans la composition immunogène selon l'invention (Figure 1). La structure tertiaire induite par les interactions hydrophobes aux extrémités N et C terminales joue donc un rôle pour l'induction d'une réponse immunitaire humorale importante et spécifique. Ces interactions de type hydrophobe sont assez fortes pour créer une conformation en boucle définie comme étant la structure tertiaire équivalente de la structure naturelle des boucles extracellulaires de la protéine P-170. Cette conformation « naturelle » se retrouve exposée de façon stable à la surface du véhicule, de préférence à la surface des liposomes, dans le cas des conjugués couplés à quatre résidus d'acide gras en C12 à C24 par molécule de peptides. La diminution par un facteur deux de ces interactions hydrophobes peut être insuffisante pour obtenir la structure « naturelle » conduisant à une inhibition presque totale du potentiel antigénique des conjugués selon l'invention.

35

Tableau III :

Nom des conjugués	Séquences en acides aminés	Nombre de chaînes palmityl	Détection des anticorps par Dot Blot	Titre en Ac unités de fluorescence
mpp1	K-G-GNMTDSFTKAEASILPS ITNQSGPNSTLIISNSSLEEE- G-K-K-NH ₂	4	-	<10
mpp'1a	G-GNMTDSFTKAEAS-G-K-NH ₂	2	pas testé	pas testé
mpp'1b	G-LPSITNQSGPNS-G-K-NH ₂	2	-	<10
mpp'1c	G-TLIISNSSLEEE-G-K-NH ₂	2	-	<10

mpp'2	G-KVLTSFTNKEHQAYAK-G-K-NH2	2	-	<10
mpp2	K-G-KVLTSFTNKEHQAYAK-G-K-K-NH2	4	+	360
mpp'4	G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-NH2	2	+	100
mpp4	K-G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-K-NH2	4	+	400

I-3 Préparations vaccinales

5 Les compositions immunogènes préparées comprennent :

Lp1 : conjugués, liposomes (DPMC, DPMG, cholestérol)

Lp2 : liposomes (DPMC, DPMG; cholestérol)

Lp3 : liposomes (DPMC, DPMG, cholestérol), MPLA, conjugués

Lp4 : conjugués.

10 Les liposomes présentent à leur surface les trois conjugués mpp1, mpp2 et mpp3 ajoutés dans un rapport molaire de 1:250 avec les phospholipides. Les solvants organiques permettant l'homogénéisation de cet ensemble sont évaporés, le film résultant, après hydratation avec du PBS ph=7,4 stérile est ajusté à une concentration finale en phospholipides de 4mM. Enfin, les liposomes en suspension sont au moment de l'immunisation mélangés à de l'Alum stérile (Pasteur Mérieux) dans un rapport volumique. Les préparations vaccinales injectées aux animaux correspondent donc aux compositions immunogènes Lp1, Lp2, Lp3 et Lp4 dans des formulations comprenant l'alum comme adjuvant de l'immunité, l'alum étant en outre capable de prolonger la durée d'absorption du vaccin.

I-4 Animaux

25 Les études ont été réalisées sur des souris B6D2F1 femelles âgées de 6 à 10 semaines et issues de croisements entre des femelles C57B1/6 et des mâles DBA/2 (Charles River Laboratories). Les souris, objet de l'expérimentation, pèsent entre 19 et 22g. Les prélèvements sanguins chez l'animal sont réalisés, 7 à 12 jours après l'immunisation, au niveau du sinus rétro-orbital.

I-5 Protocole d'immunisation

35 Les souris ont été immunisées trois fois à deux semaines d'intervalle par injection intra-péritonéale, avec 200µl de composition vaccinale. Ce protocole expérimental est conduit pour les quatre préparations sur des groupes de neuf souris B6D2F1 (Iffa Credo L'Arbresle, France).

5 Pour quantifier par Dot Blot les différentes immunoglobulines induites par la vaccination, on a prélevé pour chaque souris, 100µl de sang au sinus rétro-orbital, un jour avant le rappel et 15 jours après la dernière injection. Chaque échantillon de sang a ensuite été centrifugé et le sérum isolé a été utilisé pour la quantification.

I-6 Agents anticancéreux

10 La doxorubicine (Dox) (Sigma) et la vinblastine (VLB) sont utilisées en tant qu'agents anticancéreux dans le protocole de modèle *in vivo* d'induction de tumeurs solides et de chimiothérapie après immunisation.

15 La doxorubicine est le chef de file des antinéoplasiques cytostatiques de la famille des anthracyclines, elle est donc largement utilisée seule ou en association dans le traitement de nombreuses tumeurs. Le mode d'action principal de la doxorubicine semble être au niveau de l'inhibition de l'ADN topoisomérase II. Mais comme tous les médicaments anticancéreux, la doxorubicine présente des effets secondaires en particulier d'ordre hématologique, digestif, inflammatoire et surtout toxicité cardiaque qui en limite l'usage dans les traitements chimiothérapeutiques.

20 La solution de doxorubicine est utilisée à une concentration de 10^{-3} mol/l dans les présentes expérimentations.

25 La vinblastine est un vinca alcaloïde couramment utilisé en thérapeutique en tant qu'agent bloquant les mitoses cellulaires en métaphase, d'où son nom de poison du fuseau mitotique. La vinblastine tue donc préférentiellement les cellules qui se divisent rapidement, elle est donc particulièrement appropriée pour le traitement du cancer des testicules et le sarcome de Kaposi. Néanmoins, les manifestations toxiques de la vinblastine sont nombreuses et variées, la principale de ces manifestations étant la toxicité sanguine. Enfin, la solution de vinblastine est utilisée à une concentration de 10^{-2} mol/l dans les essais expérimentaux de la présente invention.

I-7 Modèle *in vivo* d'induction de tumeurs solides

35 La lignée cellulaire B16R, originaire d'un mélanome murin et sélectionnée pour sa résistance à la doxorubicine, a été choisie dans la présente invention pour le développement de tumeurs solides. Les cellules B16R sont cultivées *in vitro*, récoltées en phase exponentielle de croissance et nettoyées avec un tampon salin phosphaté (PBS) avant leur administration par injection sous cutanée dans le flanc arrière de la souris. Le volume d'injection est de 50µl d'une suspension de 1.10^6 cellules B16R en NaCl 0.85% (Candido KA et al Cancer Res 2001, 61 (1) :228-236). Les souris développent un mélanome de taille moyenne de 2.0g ± 1.2g dans une période comprise entre 22 et 24 jours après inoculation de cellules cancéreuses.

Après développement tumoral, la lignée B16R s'est confirmée résistante aux traitements chimiothérapeutiques avec la doxorubicine. Dès lors les conditions expérimentales précédentes ont servi de modèle pour induire une tumeur solide à partir de cellules P388R murines (cellules de néoplasme lymphoïde murin caractérisées et utilisées comme cellules de référence pour leurs propriétés MDR – Kohls WD. et al Cancer Res 1986 Sep, 46(9) :4352-6) résistantes également à la doxorubicine .

D'autres cellules tumorales peuvent être mises en œuvre dès lors qu'elles présentent une résistance à la chimiothérapie testée.

10

I-8 Protocole de chimiothérapie après immunisation

Un protocole de chimiothérapie utilisant deux agents anticancéreux, la vinblastine et la doxorubicine, a été établi tel que décrit Figure 3. Le traitement chimiothérapeutique des souris préalablement immunisées avec les préparations vaccinales Lp1 et Lp2 débute un jour après l'injection sous-cutanée de 10^6 cellules cancéreuses P388R (jour 0), par une injection hebdomadaire de doxorubicine à la dose de 5,5 mg/kg (jours 1, 10 et 22) suivie de l'injection alternée de vinblastine à la dose de 2,5mg/kg (jours 4 et 14). Pendant cette période la prise de nourriture, d'eau et le poids des souris ainsi que leur survie ont été enregistrés. Avant l'injection avec les cellules P388R, des échantillons de sérum de souris ont été prélevés pendant une période comprise entre 15 et 45 jours après l'immunisation, pour quantifier les anticorps anti-P170 et contrôler leur activité.

I-9 Analyse de la réponse immunitaire par Dot-Blot

Les conjugués selon l'invention servant de molécules antigéniques, dilués dans du PBS, sont dans un premier temps déposés à température ambiante sur les membranes de nitrocellulose. Au bout de 30 minutes, ces molécules antigéniques sont bloquées avec 3ml d'une solution contenant du PBS-5% lait écrémé. Les membranes sont incubées pendant 2 heures, à température ambiante, sans lavage, avec 24µl de sérum murin dilué préalablement volume à volume avec du PBS, dans 2ml de PBS contenant 1% de lait écrémé et 0,1% de tween 20. Ledit sérum murin a été prélevé dans une période de 15 à 45 jours après la troisième immunisation. Après trois lavages en PBS-1% lait écrémé-0.1% tween 20, les membranes sont séquentiellement incubées pendant 1 heure à température ambiante, dans 3ml de PBS-1% lait écrémé-0.1% tween 20 contenant l'anticorps anti-souris peroxydase secondaire dilué au 1/3000^{ème}, puis après 2 lavages, dans 3ml de PBS-1% lait écrémé-0.1% tween 20. Les membranes sont ensuite lavées une fois 10 minutes dans du PBS seul et gardées une nuit au réfrigérateur à 4°C dans 500µl de PBS. Un substrat pour la peroxydase chimioluminescence (kit ECLTM, AMERSHAM Pharmacie Biotech) est déposé à la surface des membranes (0.125ml/cm²), et laissé pendant une

minute, puis les membranes sont égouttées et placées en cassette « froide » entre 2 films Saran®. Les membranes sont immédiatement exposées en autoradiographie, la lumière émise résultant de la réaction d'oxydation du luminol par la peroxydase étant collectée sur des films KODAK X-OMAT avec des temps variants de quelques minutes à 1 heure selon l'importance du signal. Les titres en anticorps sont estimés à l'aide d'un densitomètre adapté au système supra. La sensibilité de la réaction de chimioluminescence présente un seuil de détection des anticorps induits évaluée à 0,2ng/ml dans ces conditions expérimentales.

Les protocoles des expérimentations pour évaluer la réponse immunitaire *in vivo* chez les souris immunisées par les préparations vaccinales décrites supra utilisent des anticorps anti-mpp1, mpp2, mpp4 ainsi que des anticorps secondaires anti-murin spécifiques Ig (M, G3, G2a, G2b, G1).

I-10 Réponse immunitaire *in vivo* chez les souris B6D2F1 immunisées par les préparations vaccinales

La réponse immunitaire des souris B6D2F1 immunisées par le vaccin contrôle Lp2 est prédominante en anticorps IgM. La concentration des anticorps IgM reste constante au cours des trois immunisations témoignant d'une réponse immunitaire de type aspécifique polyclonale due à la présence de MPLA. La valeur des anticorps IgM a été soustraite à celle trouvée dans les sérums de souris immunisées par le vaccin Lp1 (Figure 4).

Les souris immunisées par la préparation vaccinale Lp4 présentent des anticorps IgM anti-mpp1, anti-mpp2 et anti-mpp3 suite à la première immunisation. Cette quantité d'anticorps IgM diminue jusqu'à disparaître suite à la troisième immunisation pour laisser apparaître une réponse immunitaire prépondérante en anticorps IgG1 (Figure 5).

L'immunisation des souris par le vaccin Lp3 induit l'expression d'anticorps IgM après la première injection. Le titre en anticorps IgM diminue après la deuxième immunisation, période pendant laquelle la réponse immunitaire devient prépondérante en anticorps IgG2b. Après la troisième injection le titre en anticorps IgG1 est maximal, en outre cette réponse immunitaire est positive pour les trois conjugués, le conjugué mpp2 étant le plus immunogène (Figure 6).

L'immunisation des souris par la préparation vaccinale Lp1 induit l'apparition prédominante d'anticorps IgM dirigé contre les boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la protéine P-170. La quantité d'anticorps IgM diminue au cours des deuxième et troisième immunisations pour laisser apparaître une réponse immunitaire prépondérante en anticorps IgG anti-mpp2. Les titres en anticorps IgG3, IgG2a et IgG2b sont environ deux à trois fois supérieurs à la valeur basale alors que le titre en anticorps IgG1 est cinq fois plus important (Figure 7).

On observe, par comparaison des quantités d'anticorps IgG1, que le conjugué mpp2 est respectivement 2.6 et 2 fois plus immunogène que les conjugués mpp1 et mpp4. De plus, on constate que la préparation vaccinale Lp1 induit la plus forte réponse immunitaire globale, soit les isotypes (IgM, G3, G2a, G2b, G1) correspondant à chacune des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 confondues.

Les titres en anticorps induits par le conjugué mpp1 sont significatifs et comparables en valeur aux titres en anticorps détectés pour les conjugués mpp2 et mpp4 contrairement aux résultats observés avec Tosi et coll. (1995: Biochemical and biophysical research communications 212(2) : 494-500).

Après avoir déterminé la préparation vaccinale Lp1 comme ayant le meilleur pouvoir immunogène, son innocuité a été contrôlée sur une période de 18 mois après la dernière immunisation. Les souris immunisées ne présentent pas de variations de poids significatives par rapport aux souris immunisées par le vaccin contrôle Lp2. De plus, aucune modification comportementale, par exemple eu égard à la vigilance ou à l'appétit, n'a été observée chez les animaux vaccinés avec la préparation vaccinale Lp1. Enfin, des analyses histopathologiques des organes exprimant de façon naturelle la protéine P-170 (rate, foie, reins, glandes surrenales, pancréas, ovaires, cœur et poumons) ont démontré l'absence de toxicité induite et/ou d'auto-immunité chez les souris immunisées par la préparation vaccinale Lp1. En effet, les seules lésions observables en position intra péritoneales et en périphérie des organes (foie, pancréas, rate et ovaires) ont été attribuées exclusivement à l'utilisation d'Alum dans la composition immunogène. Des analyses complémentaires sur la recherche de l'agent d'induction des lésions observées ont confirmé ce résultat.

I-11 Evaluation *in vivo* de l'activité anti-chimiorésistance associée à l'immunisation par la préparation vaccinale Lp1

L'étude *in vivo* de l'évolution du phénotype de résistance multidrogues chez les souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 et Lp2 (contrôle) a été initiée suivant un protocole d'induction de tumeurs solides suivi du plan de traitement chimiothérapeutique. Le traitement anticancéreux débute 1 jour après l'inoculation des cellules cancéreuses.

Préalablement à l'injection des cellules P 388R aux souris immunisées, les titres en anticorps dans les sérums des souris immunisées avec la préparation vaccinale Lp1 ont été déterminés : respectivement 100%, 40% et 80% des sérums présentaient des anticorps de type IgG1 anti-mpp1, 2 et 4 avec une valeur moyenne de 0,3, 0,21 et 0,33 µg/ml (1U correspond à 0,2µg/ml).

Le temps de survie des souris immunisées par le vaccin Lp1 et Lp2 a été représenté en fonction du temps (Figure 8).

5 Les résultats graphiques montrent que le temps moyen de survie du groupe de souris immunisées par Lp1 est de 39 jours alors que dans le groupe vacciné par la préparation Lp2, il est de 22 jours. Les souris immunisées par la préparation vaccinale Lp1 de façon préventive ont donc une augmentation de 77% du temps moyen de survie par rapport au contrôle.

10 Dans le groupe Lp2, on a observé pour l'une des souris, un temps de survie de 70 jours.

15 Cette augmentation de 77% du temps de survie est observée alors même que le traitement chimiothérapeutique en tant que tel n'a été administré que 22 jours à compter de l'injection des cellules cancéreuses résistantes. Or, on observe que le taux de survie chute à compter de la fin de l'administration des anticancéreux, en conséquence on peut en déduire qu'une réversion complète serait observée si le traitement chimiothérapeutique se poursuivait sachant que seul ce dernier a un effet curatif contrairement aux auto-anticorps obtenus chez le patient immunisé par la composition selon la présente invention.

20 Ces résultats sont très prometteurs puisque les meilleurs résultats publiés obtenus dans le traitement de la résistance multidrogues avec le même modèle de cancer décrivaient une augmentation de survie de 49% chez des souris traitées par le S9788 aux doses de 100mg/kg/jour (Pierré et coll. 1992. Invest New Drug. 10 : 137-148). De plus, Yang et coll. (1999. BBRC. 266 : 167-173) ont observé, avec la même lignée cellulaire, une augmentation de survie de 35% chez des souris traitées par la vincristine et la ciclosporine A. D'autres auteurs ont encore démontré que certains révertants comme le trans-flupenthixol peuvent accélérer la mortalité par une augmentation du potentiel invasif des cellules cancéreuses.

25 Ces résultats sont d'autant plus appréciables que les modèles expérimentaux murins de cancers sont très exigeants sur l'efficacité du traitement puisque dès l'inoculation les cellules cancéreuses ont un degré de résistance supérieur à celui observé en clinique. Cette constatation implique que les agents de réversion soient actifs dès l'injection des cellules cancéreuses, or on note que ces agents sont généralement actifs à des concentrations cytotoxiques atteintes progressivement au cours du traitement.

30 L'immunisation par la préparation vaccinale Lp1 induit chez les souris la formation d'auto-anticorps actifs capables d'inhiber *in vivo* rapidement et durablement la résistance à la chimiothérapie. L'immunisation par le vaccin Lp1 permet donc d'inhiber rapidement la chimiorésistance et de rétablir *in vivo* l'activité des anticancéreux chez les patients devenus réfractaires au traitement chimiothérapeutique. Au cours d'expérimentations complémentaires, les auto-anticorps circulants chez les souris immunisées par la préparation Lp1 n'ont induit, aucune cytotoxicité, aucun développement de lésions auto-immunes ni de majoration du potentiel invasif des cellules cancéreuses.

5 Les descriptions qui précèdent mettent en particulier en œuvre des peptides de la protéine P170 murine. Les protocoles décrits sont cependant naturellement applicables de façon similaire à la synthèse de tout autre peptide, notamment ceux qui ont été décrits ci-dessus pour la protéine P170 humaine.

Revendications

1. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend d'une part un véhicule et d'autre part, en tant que structure antigénique, des conjugués comprenant tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins un peptide dérivé d'une boucle extracellulaire de la protéine P-170, chaque peptide étant associé à au moins deux molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24 pour, dans des conditions d'administration appropriées, permettre l'induction d'anticorps anti-P-170.
2. Composition immunogène selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle permet l'induction d'anticorps anti-P-170 pour la réversion de la résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer.
3. Composition immunogène selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins deux boucles extracellulaires de la protéine P-170.
4. Composition immunogène selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés d'au moins trois boucles extracellulaires de la protéine P-170.
5. Composition immunogène selon les revendications 1 à 4, dans laquelle les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés sélectionnés parmi les peptides dérivés des boucles extracellulaires 1, 4 et 6 de la protéine P-170 humaine, lesdits conjugués permettant l'induction d'anticorps anti-P-170 humains (anti-hpp).
6. Composition immunogène selon la revendication 5, dans laquelle les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés de peptides dérivés des boucles 1 de la protéine P-170 humaine correspondant aux trois peptides, 1a, 1b et 1c, résultant de la coupure de ladite boucle 1 extracellulaire au niveau des sites de glycosylation.
7. Composition immunogène selon les revendications 1 à 4, dans laquelle les conjugués comprennent tout ou partie des séquences d'acides aminés sélectionnés parmi les peptides dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la protéine P-170 murine, lesdits conjugués permettant l'induction d'anticorps anti-P-170 murins (anti-mpp).

8. Composition immunogène selon les revendications 1 à 6, caractérisée en ce que tout ou partie des séquences d'acides aminés des peptides des conjugués sont respectivement choisis parmi les séquences d'acides aminés suivantes :
pour la boucle 1 :

le peptide 1 SEQ ID NO 4:
GEMTDIFANAGNLEDLLMSNITNRSDINDTGFF
MNLEEDMTRYAYYS
ou le peptide 1a SEQ ID NO 5:
GEMTDIFANAGNLEDLLMS
ou le peptide 1b SEQ ID NO 6:
NITNRSDINDTGFF
ou le peptide 1c SEQ ID NO 7:
MNLEEDMTRYAYYS

10 pour la boucle 4 : SEQ ID NO 8: FSRIIGVFTRIDDPETKRQNSNLFS
pour la boucle 6 : SEQ ID NO 10: FRFGAYLVAHKLMSFED
et / ou leur combinaison.

15 9. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que chaque conjugué comprend quatre molécules d'acide gras de chaîne carbonée comprise entre C12 et C24.

20 10. Composition immunogène selon la revendication 9, caractérisée en ce que les molécules d'acide gras ne sont pas présentes sous forme monoinsaturés et / ou polyinsaturés.

25 11. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle les conjugués sont tétrapalmitoylés.

30 12. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 caractérisée en ce que les conjugués comprennent en outre une ou plusieurs molécules de PEG.

35 13. Composition immunogène selon les revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le véhicule choisi pour présenter les conjugués est choisi dans le groupe consistant en des liposomes, des protéines membranaires bactériennes, des protéines Omp d'entérobactéries, des nanoparticules, des miscelles, des particules d'or, des microbilles et des virosomes.

40 45 14. Composition immunogène selon la revendication 13, caractérisée en ce que le véhicule choisi consiste en des liposomes.

15. Composition immunogène selon la revendication 14, dans laquelle les conjugués et les liposomes sont dans un rapport molaire compris entre 1/10 et 1/1000, de préférence de 1/250.

5 16. Composition immunogène selon les revendications 14 et 15, dans laquelle les liposomes sont de préférence obtenus par mélange des phospholipides dimyristoylphosphatidylcholine (DPMC), dimyristoylphosphatidylglycerol (DPMG) et cholestérol.

10 17. Composition immunogène selon la revendication 16, dans laquelle le mélange de DPMC, DPMG et cholestérol est dans les proportions 0.9 :0.1 :0.7.

15 18. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, comprenant en outre au moins un adjuvant.

20 19. Composition immunogène selon la revendication 18, dans laquelle l'adjuvant est choisi dans le groupe consistant en de l'Alum, du phosphate de calcium, de l'interleukine 1, du monophosphoryl lipide A (MPLA) et/ou des microcapsules de protéines et de polysaccharides.

25 20. Composition immunogène selon la revendication 19, dans laquelle l'adjuvant est de préférence l'Alum.

25 21. Peptides dérivés d'au moins une boucle extracellulaire de la protéine P-170 et permettant l'induction d'anticorps anti-P-170, caractérisés en ce qu'ils sont respectivement choisis parmi les séquences d'acides aminés suivantes :
SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 17.

35 22. Méthode de préparation de la composition immunogène selon les revendications 1 à 20 comprenant les étapes de:

- a) synthèse des séquences d'acides aminés des boucles extracellulaires des peptides des conjugués sur support solide selon la stratégie Boc/benzyle,
- b) allongement des peptides des conjugués en position N- et/ou C-terminale par un ou plusieurs résidus d'acides aminés pour permettre l'association aux molécules d'acides gras,
- c) déprotection des fonctions amines des lysines N- et C-terminales afin de les coupler avec les acides gras,
- d) clivage par un acide fort des conjugués synthétisés sur support solide,

e) et optionnellement, purification des conjugués,

23. Méthode de préparation de la composition immunogène selon la revendication 22 caractérisée en ce que l'association des peptides aux molécules d'acides gras implique alternativement à l'association en position N- et/ou C-terminale une association à des résidus d'acides aminés internes de la séquence de peptides.

24. Méthode de préparation de la composition immunogène selon les revendications 22 et 23, caractérisée en ce que le support solide est une résine.

25. Méthode de préparation de la composition immunogène selon la revendications 22 à 24, caractérisée en ce qu'en outre chaque peptide est associé à plusieurs molécules d'acide gras par le biais d'une ou de plusieurs molécules de PEG.

26. Méthode de préparation de la composition immunogène selon la revendications 22 à 25 caractérisée en ce que les conjugués obtenus sont ensuite présentés à la surface des liposomes.

27. Méthode d'immunisation caractérisée en ce qu'elle comprend une première administration, de la composition immunogène selon les revendications 1 à 20, et une administration de rappel de ladite composition immunogène.

28. Méthode d'immunisation selon la revendication 27, caractérisée en ce la méthode d'immunisation est mise en œuvre de manière concomitante ou précédent un traitement anticancéreux.

29. Anticorps induit contre la P-170 humaine ou murine caractérisé en ce qu'il se lie de façon spécifique aux peptides des conjugués de la revendication 21.

30. L'anticorps selon la revendication 29, caractérisé en que ledit anticorps est un anticorps polyclonal.

31. L'anticorps selon la revendication 29, caractérisé en que ledit anticorps est un anticorps monoclonal.

32. L'anticorps selon les revendications 29 à 31, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi le groupe comprenant les Isotypes IgG1, IgG2, IgG3 et un IgM.

33. L'anticorps selon la revendication 32, caractérisé en que l'anticorps Ig2 est du sous type 2a ou 2b.

- 5 34. Utilisation de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, pour la fabrication d'un vaccin destiné au traitement et/ou la prévention d'une résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer.
- 10 35. Utilisation de la composition immunogène selon la revendication 34, dans laquelle le cancer atteint le rein, le foie, le colon, l'intestin, la prostate, le sein, la vessie, le cerveau, le sang (leucémie) et/ou les tissus médulaires (myélome).
- 15 36. Utilisation de la composition immunogène selon la revendication 34 caractérisée en ce que le cancer est une tumeur solide exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine.
- 20 37. Utilisation de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, en association avec un traitement anticancéreux.
- 25 38. Méthode de traitement et/ou de prévention d'une résistance multidrogues apparaissant chez un patient atteint d'un cancer comprenant l'administration de la composition immunogène suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.
- 30 39. Méthode de traitement et/ou de prévention selon la revendication 38, dans laquelle le cancer atteint le rein, le foie, le colon, l'intestin, la prostate, le sein, la vessie, le cerveau, le sang (leucémie) et/ou les tissus médulaires (myélome).
- 35 40. Méthode de traitement et/ou de prévention selon la revendication 38, caractérisée en ce que le cancer est une tumeur solide exprimant le gène MDR1 codant pour la protéine P-170 humaine.
41. Kit d'exploitation de la composition immunogène comprenant la composition immunogène selon les revendications 1 à 20, et, optionnellement, des réactifs et/ou des instructions d'utilisation.

1/8

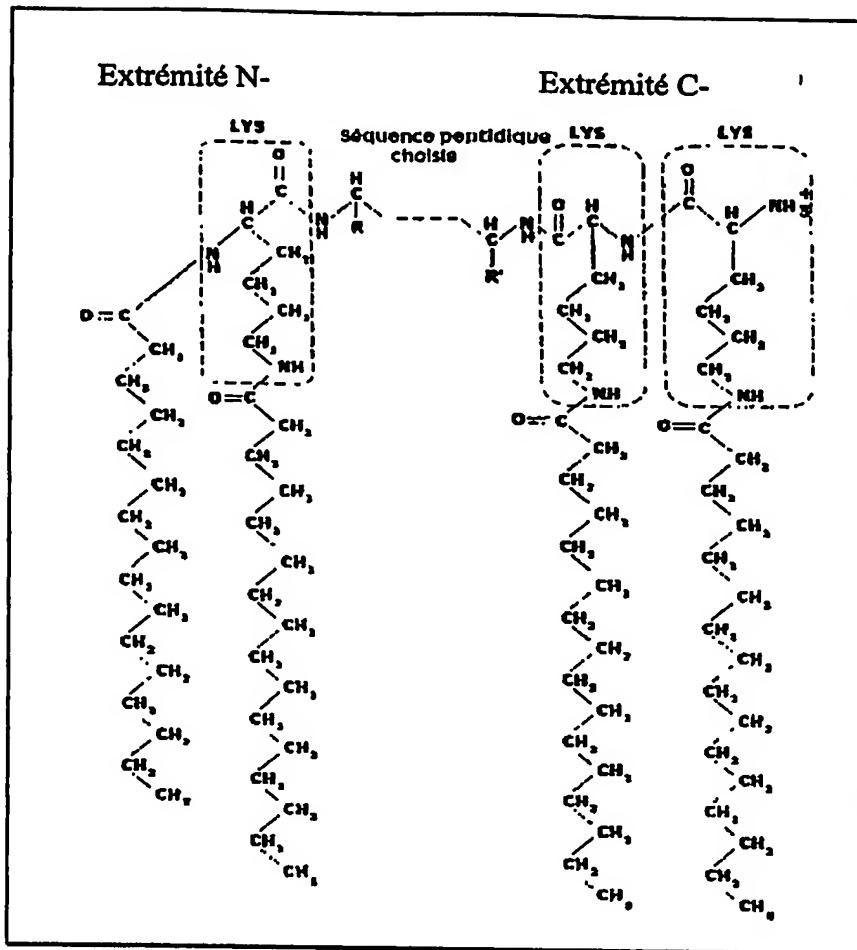
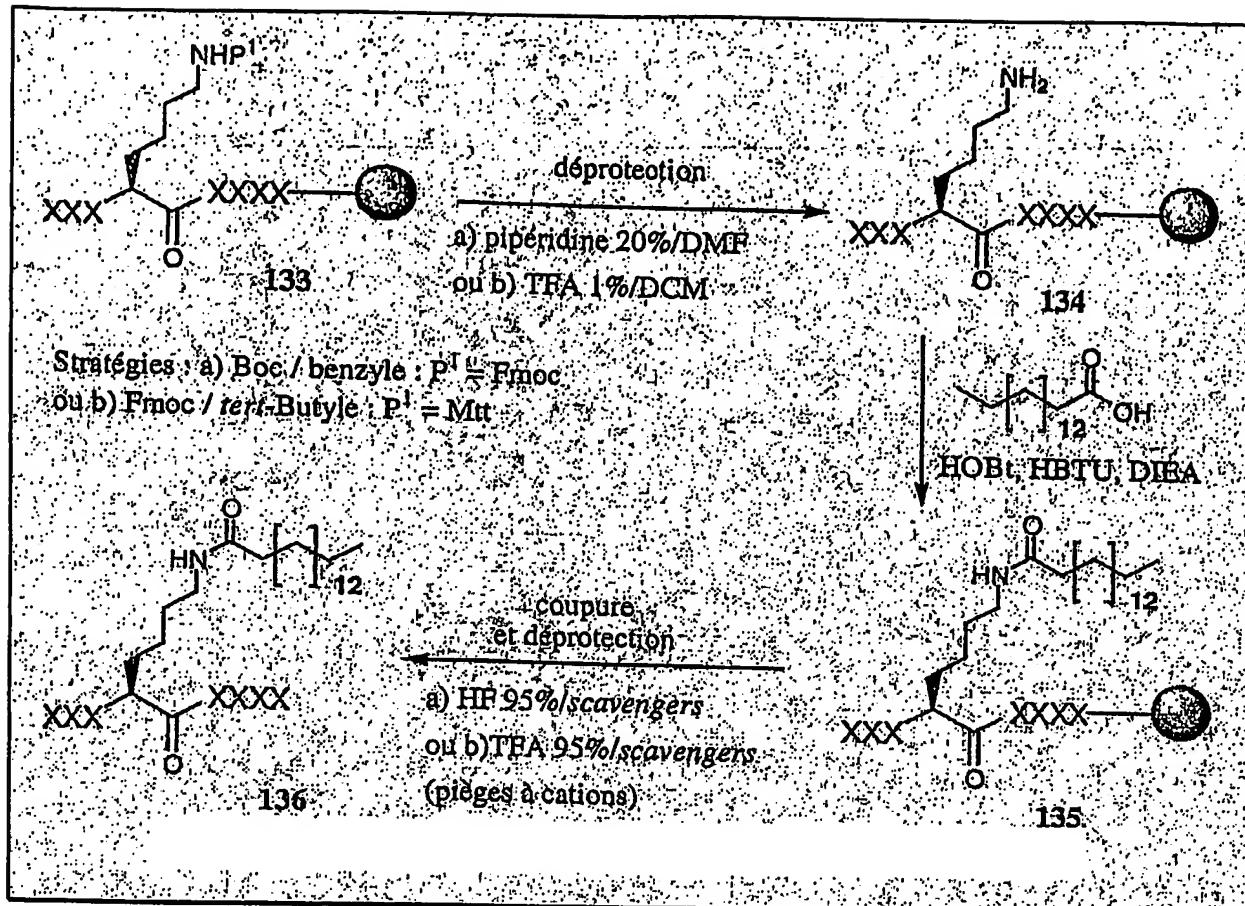


Fig. 1

2/8

**Fig. 2**

3/8

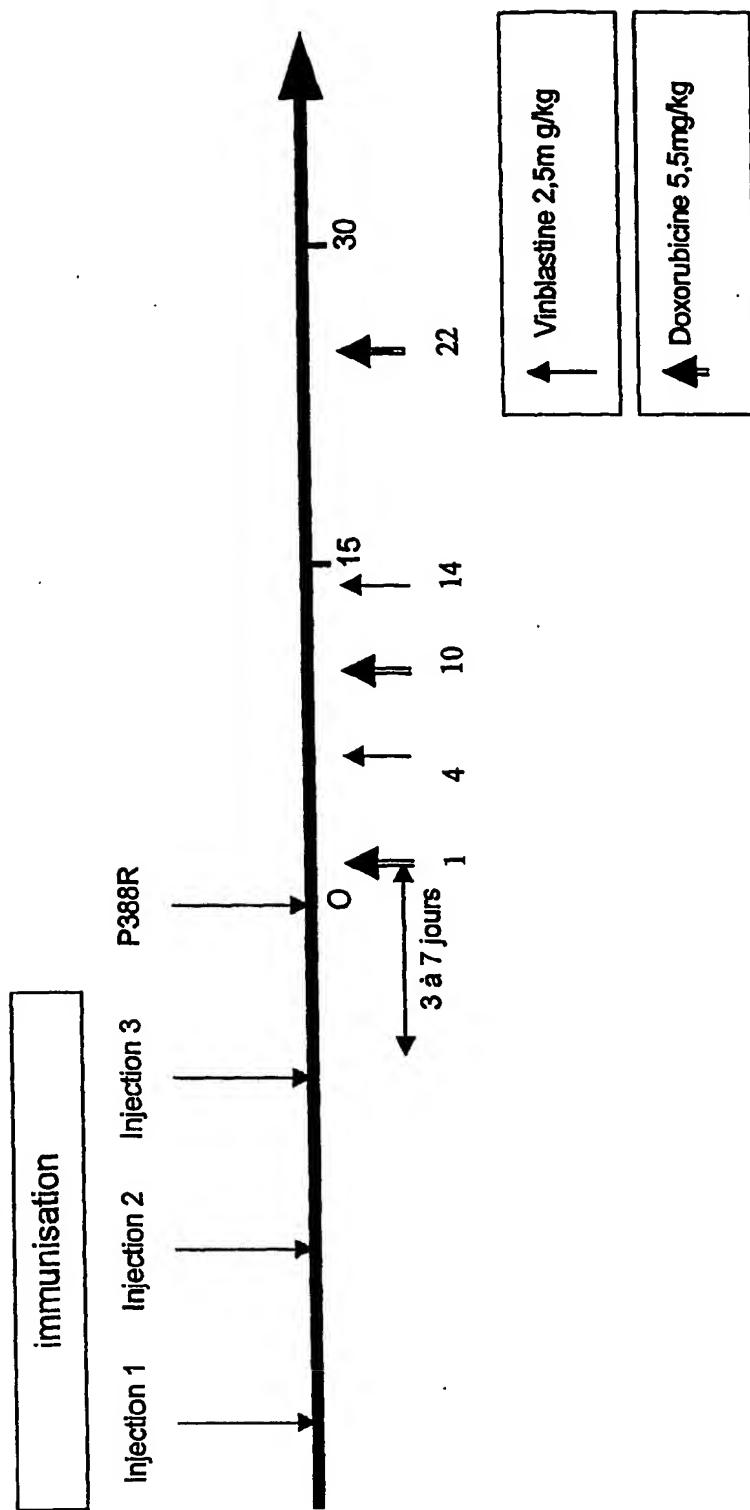
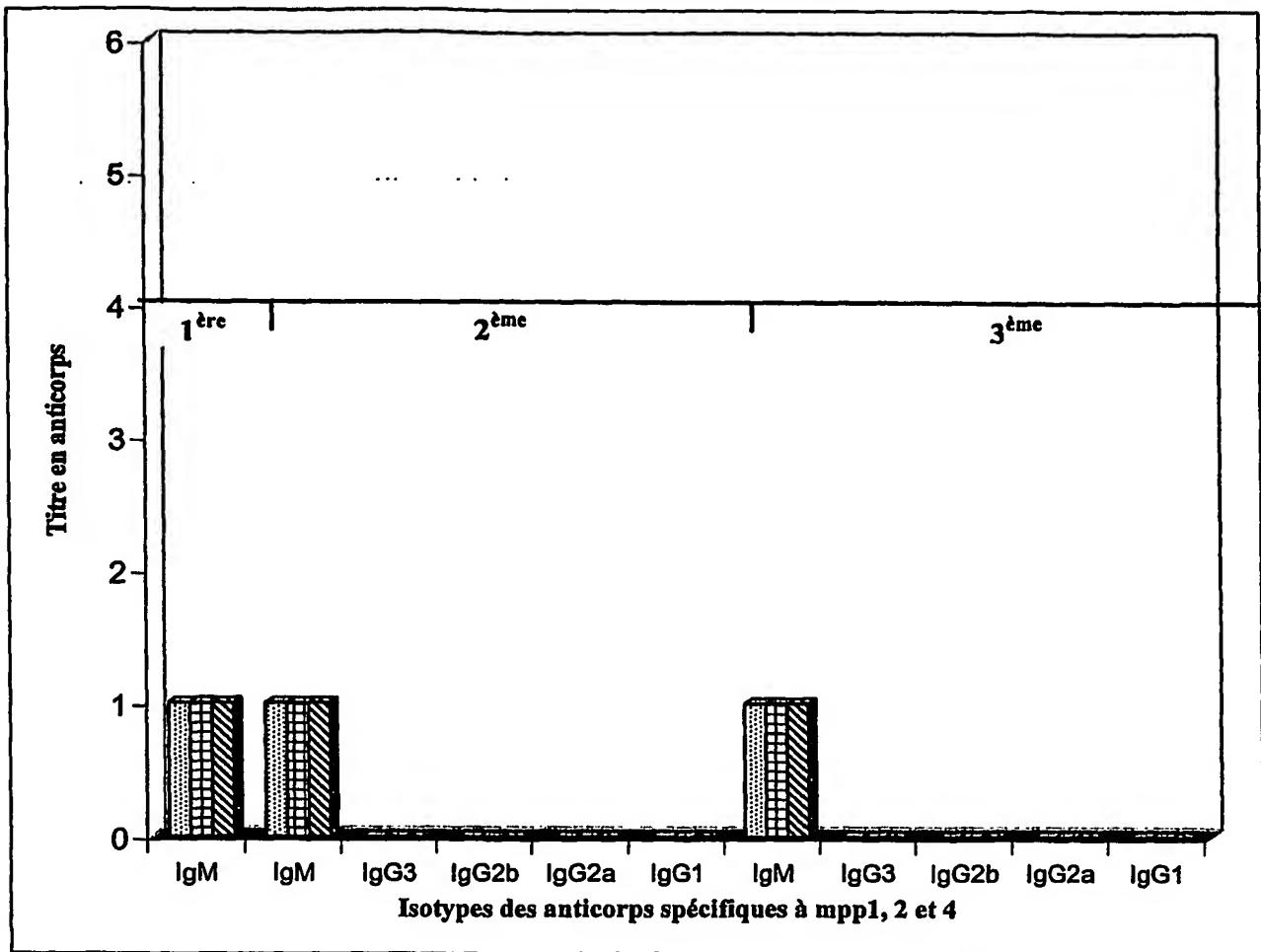


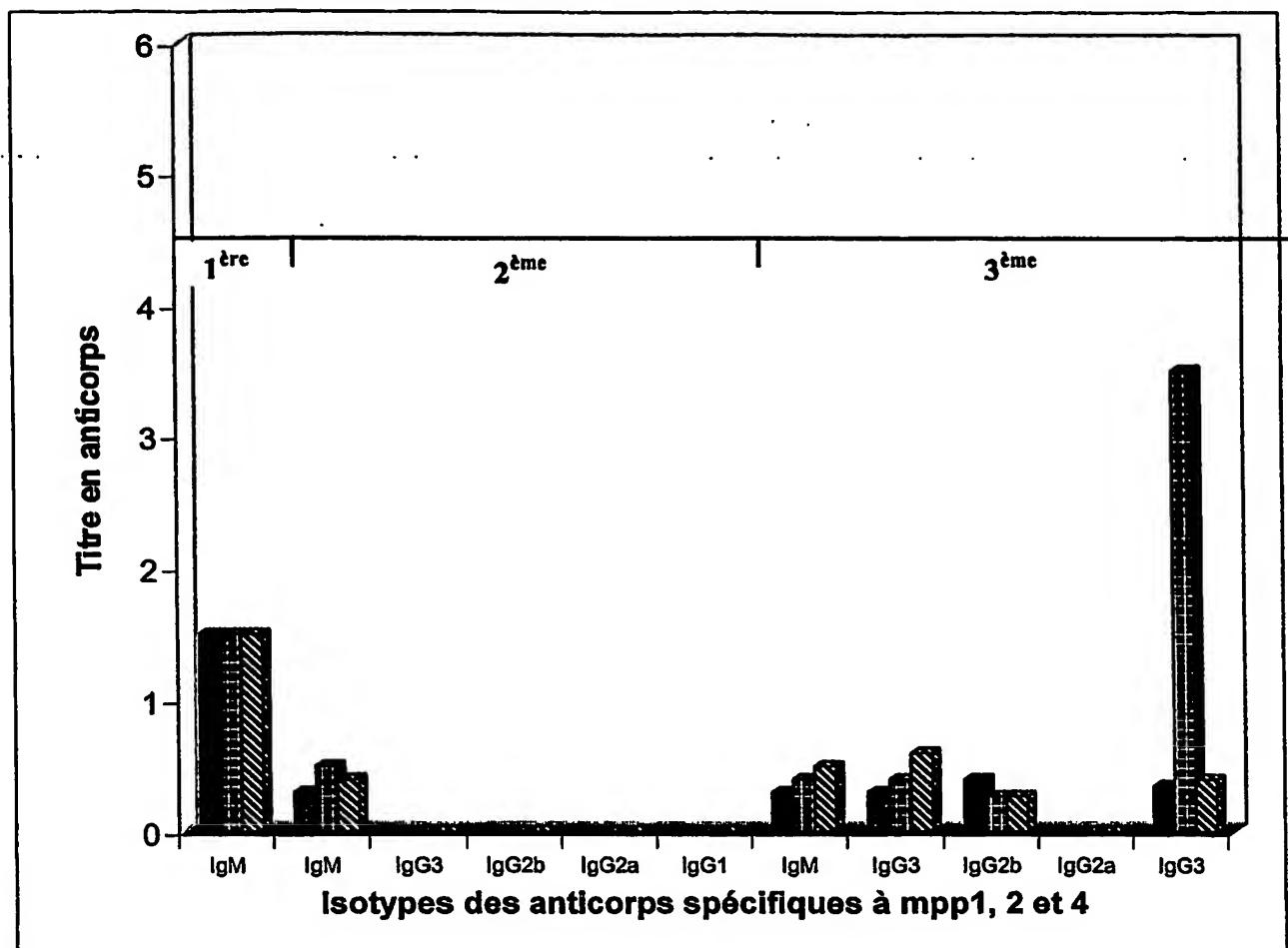
Fig. 3

4/8



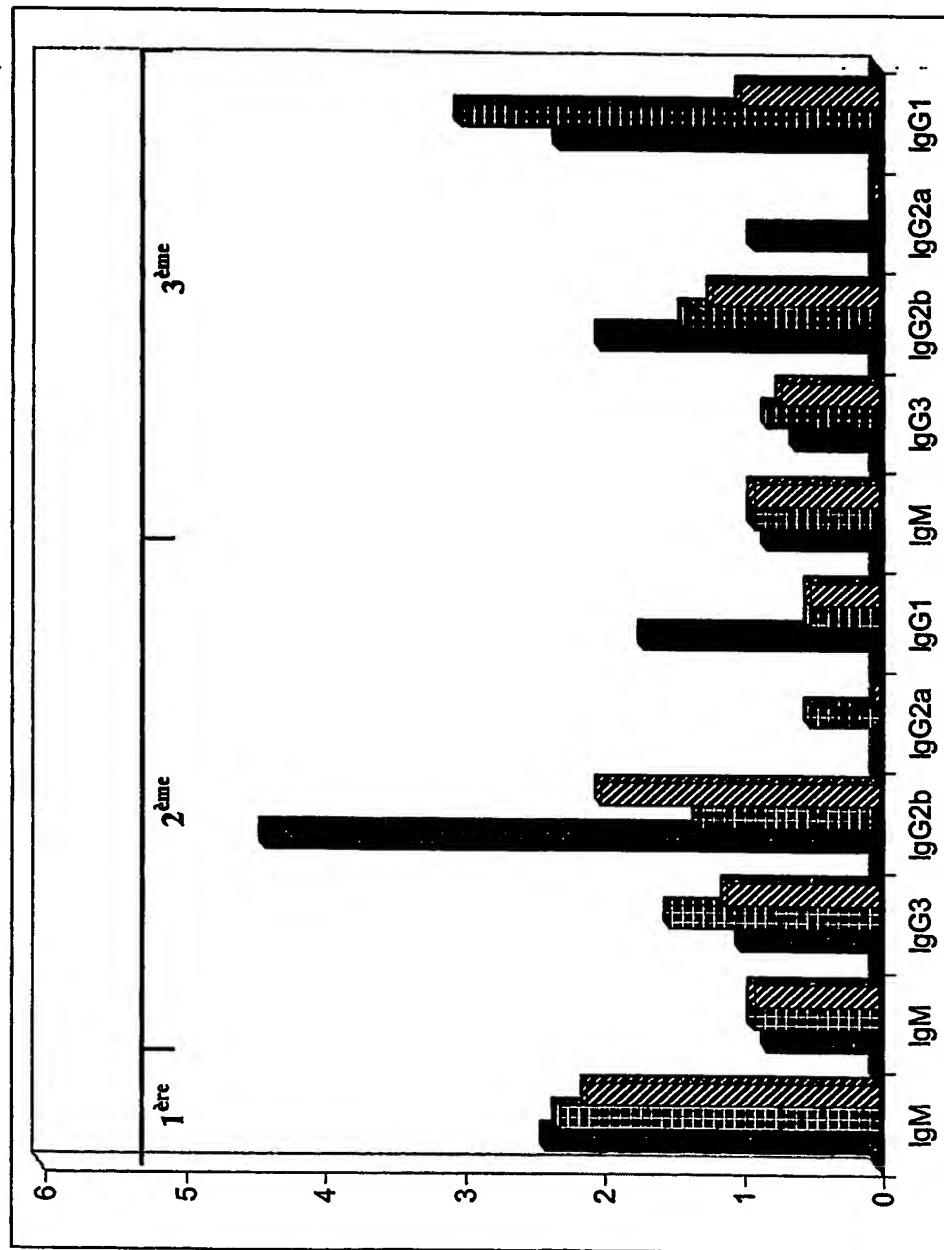
Anticorps anti-mpp1 ■■■, anticorps anti-mpp2 ■■■■, anticorps anti-mpp4 ■■■■■

Fig. 4

5/8

Anticorps anti-mpp1 [■], anticorps anti-mpp2 [■■], anticorps anti-mpp4 [■■■]

Fig. 5



Anticorps anti-mpp1 █, anticorps anti-mpp2 █, anticorps anti-mpp4 █

Fig. 6

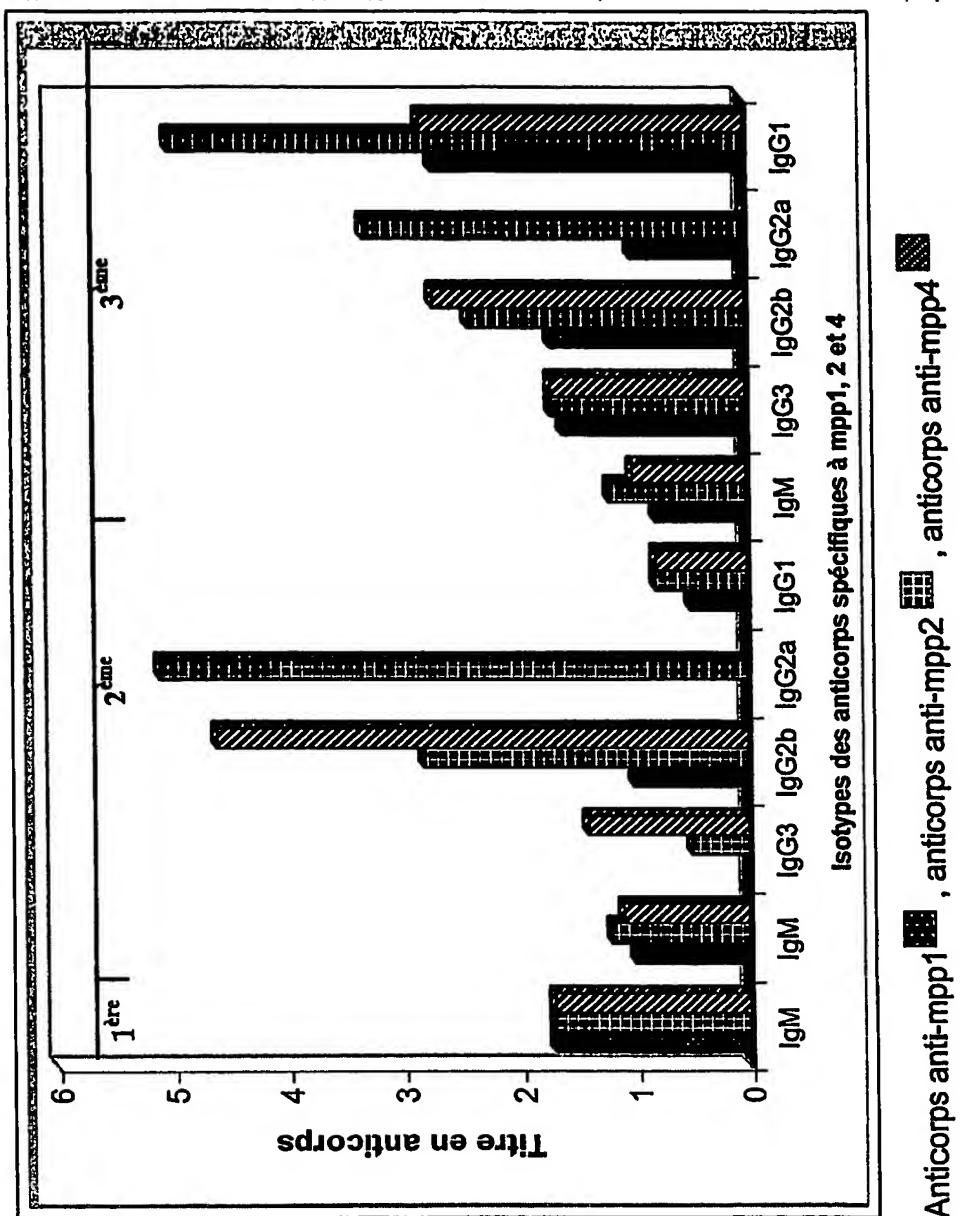
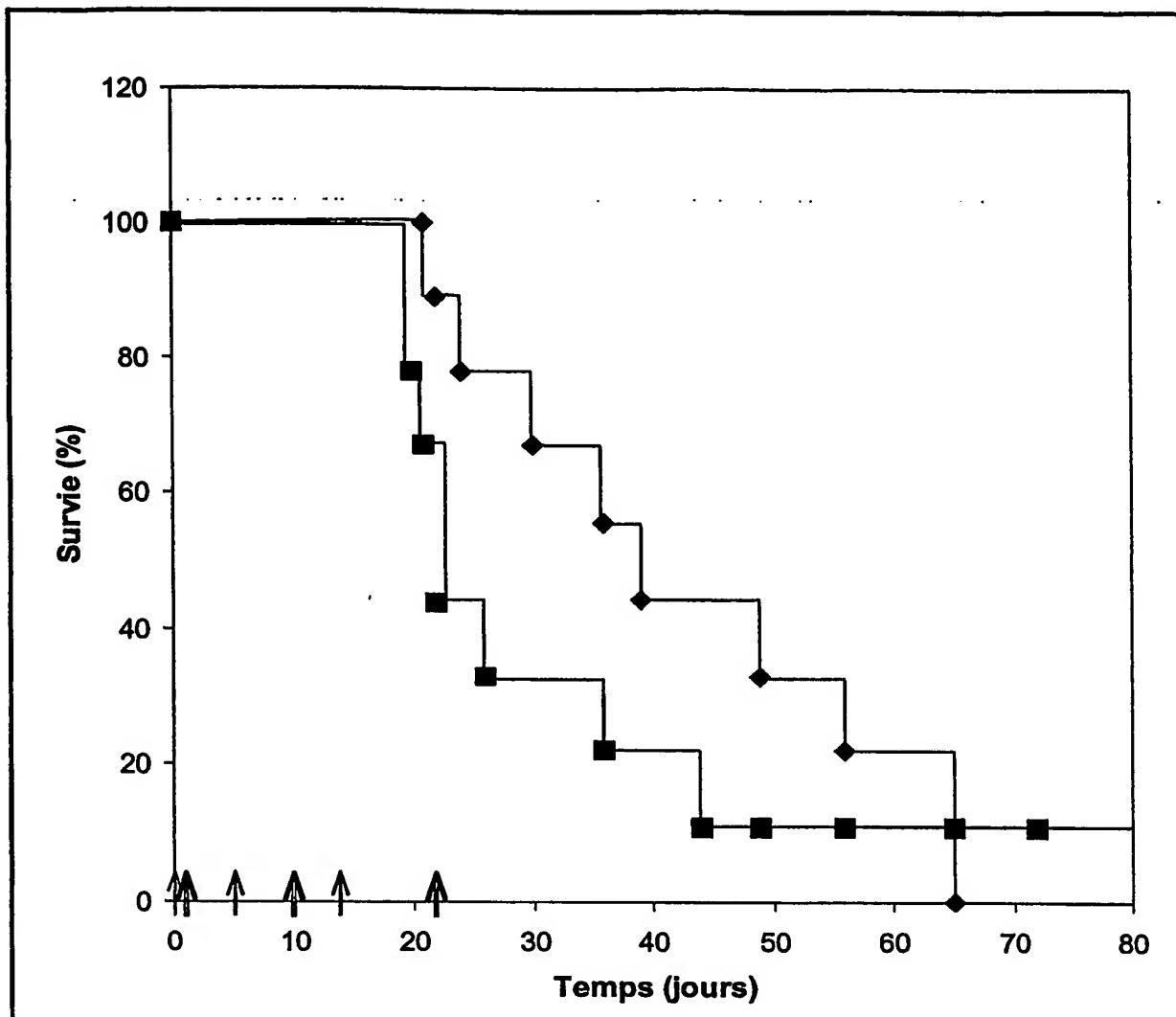


Fig. 7

8/8

Lp1 ♦ et Lp2 ■

Doxorubicine ↑ Vinblastine ↑

Fig. 8

SEQUENCE LISTING

<110> University of Reims
AC Immune S.A.

<120> VACCIN THERAPEUTIQUE CIBLE CONTRE LA P-GLYCOPROTEINE 170
POUR INHIBER LA RESISTANCE MULTIDROGUES DANS LE TRAITEMENT DES
CANCERS

<130> ACI PCT 001

<150> FR 03 091 88 000
<151> 2003-07-25

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Gly Gly Asn Met Thr Asp Ser Phe Thr Lys Ala Glu Ala Ser Ile
1 5 10 15

Leu Pro Ser Ile Thr Asn Gln Ser Gly Pro Asn Ser Thr Leu Ile Ile
20 25 30

Ser Asn Ser Ser Leu Glu Glu Gly Lys Lys
35 40

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Gly Lys Val Leu Thr Ser Phe Thr Asn Lys Glu Leu Ala Tyr Ala
1 5 10 15

Lys Gly Lys Lys
20

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3 .
Lys Gly Ser Arg Asp Asp Asp Met Glu Thr Lys Arg Gln Asn Glu Asn
1 5 10 15

Gly Lys Lys

<210> 4
<211> 48
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 4

Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15

Leu Met Ser Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe
20 25 30

Phe Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser
35 40 45

<210> 5

<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 5

Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15 . . .

Leu Met Ser

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 6

Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 7

Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15 .

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 8

Phe Ser Arg Ile Ile Gly Val Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr

1 5 10 15

Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser
20 25

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 9

Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu

1 5 10 15

Phe Ser

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 10

Phe Arg Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys Leu Met Ser Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 11
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Gly Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu
1 5 10 15

Asp Leu Leu Met Ser Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr
20 25 30

Gly Phe Phe Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr
35 40 45

Tyr Ser Gly Lys Lys
50

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Gly Gly Glu Met Thr Asp Ile Phe Ala Asn Ala Gly Asn Leu Glu
1 5 10 15

Asp Leu Leu Met Ser Gly Lys Lys
20

<210> 13
<211> 19
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Gly Asn Ile Thr Asn Arg Ser Asp Ile Asn Asp Thr Gly Phe Phe

1 5 10 15

Gly Lys Lys

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Gly Met Asn Leu Glu Glu Asp Met Thr Arg Tyr Ala Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Ser Gly Lys Lys

20

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Gly Phe Ser Arg Ile Ile Gly Val Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro

1 5 10 15

Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser Asn Leu Phe Ser Gly Lys Lys

20

25

30

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Gly Phe Thr Arg Ile Asp Asp Pro Glu Thr Lys Arg Gln Asn Ser
1 5 10 15

Asn Leu Phe Ser Gly Lys Lys
20

.
<210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Gly Phe Arg Phe Gly Ala Tyr Leu Val Ala His Lys Leu Met Ser
1 5 10 15

Phe Glu Asp Gly Lys Lys
20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K39/00 A61K39/385 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/10198 A (NICOLAU YVES CLAUDE ; TOSI PIERRE FRANCOIS (US)) 11 May 1994 (1994-05-11) the whole document -----	1-41
X	TOSI P-F ET AL: "Immune response against the murine mdrl protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 212, no. 2, 17 July 1995 (1995-07-17), pages 494-500, XP002034273 ISSN: 0006-291X cited in the application the whole document ----- -/-	1-41

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

13 December 2004

21/12/2004

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008330

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MECHETNER E B & RONINSON I B: "Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 5824-5828, XP002060367 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document -----	29-33
A	TSURUO T: "Circumvention of drug resistance with calcium channel blockers and monoclonal antibodies" CANCER TREATMENT AND RESEARCH, vol. 48, 1989, pages 73-95, XP001190802 ISSN: 0927-3042 cited in the application -----	
A	CHEN C-J ET AL: "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells" CELL, vol. 47, no. 3, 7 November 1986 (1986-11-07), pages 381-389, XP000603669 ISSN: 0092-8674 -----	
T	PAWLAK-ROBLIN C ET AL: "Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic P-glycoprotein-derived peptides" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 40, no. 4, March 2004 (2004-03), pages 606-613, XP004488461 ISSN: 0959-8049 -----	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008330

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9410198	A 11-05-1994	AU WO EP	5420494 A 9410198 A1 0669941 A1	24-05-1994 11-05-1994 06-09-1995

HAPPORU DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/EP2004/008330

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K39/00 A61K39/385 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94/10198 A (NICOLAU YVES CLAUDE ; TOSI PIERRE FRANCOIS (US)) 11 mai 1994 (1994-05-11) Le document en entier -----	1-41
X	TOSI P-F ET AL: "Immune response against the murine mdrl protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 212, no. 2, 17 juillet 1995 (1995-07-17), pages 494-500, XP002034273 ISSN: 0006-291X cité dans la demande le document en entier ----- -/-	1-41

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 décembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/12/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/EP2004/008330

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MECHETNER E B & RONINSON I B: "Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, 1 juillet 1992 (1992-07-01), pages 5824-5828, XP002060367 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande le document en entier -----	29-33
A	TSURUO T: "Circumvention of drug resistance with calcium channel blockers and monoclonal antibodies" CANCER TREATMENT AND RESEARCH, vol. 48, 1989, pages 73-95, XP001190802 ISSN: 0927-3042 cité dans la demande -----	
A	CHEN C-J ET AL: "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells" CELL, vol. 47, no. 3, 7 novembre 1986 (1986-11-07), pages 381-389, XP000603669 ISSN: 0092-8674 -----	
T	PAWLAK-ROBLIN C ET AL: "Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic P-glycoprotein-derived peptides" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 40, no. 4, mars 2004 (2004-03), pages 606-613, XP004488461 ISSN: 0959-8049 -----	1-41

HAPPORI DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale N°

PCT/EP2004/008330

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9410198	A 11-05-1994	AU 5420494 A WO 9410198 A1 EP 0669941 A1	24-05-1994 11-05-1994 06-09-1995

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.